

⑩ 日本国特許庁(J P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平3-505279

⑬ 公表 平成3年(1991)11月21日

⑭ Int. Cl.
C 12 P 21/00
C 07 K 13/00

識別記号

A

庁内整理番号
8214-4B
7731-4H
8717-4B

審査請求有
予備審査請求有

C 12 N 15/00

部門(区分) 1(1)

A※

(全 28 頁)

⑯ 発明の名称 インターロイキン-1インヒビター

⑰ 特 願 平1-506393

⑱ 出 願 平1(1989)5月25日

⑲ 翻訳文提出日 平2(1990)11月27日

⑳ 国 際 出 願 PCT/US89/02275

㉑ 国際公開番号 WO89/11540

㉒ 国際公開日 平1(1989)11月30日

優先権主張 ㉓ 1988年5月27日 ㉔ 米国(US) ㉕ 199,915

⑳ 発 明 者 ハノン, チャールズ, エツチ. アメリカ合衆国 コロラド州 80301, ボウルダー, ウイロー レー 6150

㉑ 出 願 人 シナージェン, インコーポレー アメリカ合衆国 コロラド州 80301, ボウルダー, 33アールデー テッド - ストリート 1888

㉒ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外2名

㉓ 指 定 国 AT, AU, BB, BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CF(広域特許), CG(広域特許), CH, CM(広域特許), DE, DK, FI, GA(広域特許), GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NO, RO, SD, SE, SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. インターロイキン-1アルファおよびインターロイキン-1ベータからなる群から選択される少なくとも1種の物質に対して活性である実質的に精製されたインターロイキン-1インヒビター(IL-1i)。

2. 前記IL-1iが哺乳動物細胞に由来する請求の範囲1記載のIL-1i。

3. 前記IL-1iが単球から単離される請求の範囲1記載のIL-1i。

4. 前記IL-1iがヒト単球から単離される請求の範囲3記載のIL-1i。

5. 前記IL-1iが組換えDNA法により生産される請求の範囲1記載のIL-1i。

6.

(a) 宿主細胞にIL-1インヒビター活性を有するタンパク質の生産を指示するDNA配列の複製；

(b) そのDNA配列を発現させるに必要な操作エレメントを含有し、宿主細胞中に移入できかつそのなかで複製できるベクター中へのそのDNA配列のクローニング；

(c) 合成DNA配列および操作エレメントを含有するベクターの、IL-1インヒビターをコードするDNAを発現しうる宿主細胞中への移入；

(d) ベクターの増幅およびインヒビターの発現に達する条件下での宿主細胞の培養；

る条件下での宿主細胞の培養；

(e) インヒビターの収穫；および

(f) インヒビターに活性三次元構造をとらせ、それにより該インヒビターがIL-1インヒビター活性を有することとなる、

ことからなるインターロイキン-1インヒビター(IL-1i)生産のための組換えDNA法。

7. 前記DNA配列がcDNAである請求の範囲6記載の方法。

8. 前記DNA配列がゲノムポリヌクレオチド配列である請求の範囲6記載の方法。

9. 前記DNA配列が哺乳動物細胞に由来する請求の範囲6記載の方法。

10. 前記DNA配列がヒト単球細胞に由来する請求の範囲9記載の方法。

11. 前記宿主細胞が微生物である請求の範囲6記載の方法。

12. 前記微生物がE. coliである請求の範囲11記載の方法。

13. 前記宿主細胞が哺乳動物細胞である請求の範囲6記載の方法。

14. 前記哺乳動物細胞がCHO細胞である請求の範囲13記載の方法。

15. 前記DNA配列がcDNAポリヌクレオチドである請求の範囲6記載の方法。

16. 前記DNA配列がゲノムポリヌクレオチド配列である

の核酸を包含する請求の範囲17
列。

請求の範囲 6 記載の方法。

17. IL-11 の生物学的性質の少なくとも 1 つを有せしめるに十分に IL-11 重複性であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA 配列を包含する、生理学的機能を有するインターロイキン-1 インヒビター (IL-1i) をコードする単離された DNA 配列。

18. 前記 DNA塩基配列が下記配列:

70	80	90	100	110	120
CTCTCTCTCTCTTCTTCTTCCATTCAGAGACATCTCCCTCCCTCTTGGGAGAAATCCA					
T L L L L F L F L P N E E T : C P F S G A A					
130	140	150	160	170	180
GCAAGATGCCAAECCTTCAGAAATCTTGGATTTAACCGAGAAACCTCTATCTCTGAGGACAC					
S A M G A F R : I M D V H Q A T F Y L P V					
190	200	210	220	230	240
ACCAACATAGTTGCTGTGATCTCTCCAGGACCAAAATGTCAATTTTAGAAGGAAGATAGATG					
M O L V A G Y L Q G P N V N L E E K I D					
250	260	270	280	290	300
TGGTACCCTATTGAGCTCTATGCTCTCTTCTTGGAAATCCATTGGAGGGAAGATGTGCTGT					
V V P I E P H A L F L G I H G G K M C L					
310	320	330	340	350	360
CCTGTGTCAAGTCTGGTGTATGAGACCGAGCTCCAGCTGGAGGAGTAAATCAATCACTGACC					
S C V K S G D E T R L Q L E A V N I T D					
370	380	390	400	410	420
TGAGCCGAGAACAGAAAGCAGGACAGGCGCTTCCCTTTCATCCCTCAGACAGTGGCCCA					
L E E H R K K D K R A F A F I R E D S G P					
430	440	450	460	470	480
CCACCAATTTTGAGTCTGCCGCTGCCGCGTTGGTTTCTCTCTGCACAGCATGGAAAGCT					
T T S F E S A A C P G W P L C T A H E A					
490	500	510	520	530	540
ACCAGCCCTCAGGCTCACCAAATATGCTTACGGAAGGCGTCATGTCCACCAATTTCTACT					
D D P V S L T N H P D E G U H V T K F Y					
550	560	570	580	590	600
TCCAGGAGGAGGATAGTACTGTCCCAAGGCTTGTCTTCCATTCTTGATGGCAAGGAGCTG					
P G E D E R					

70	80	90	100	110	120
CTCTCTGCTCTCTCTGTTCCATTCAGAGACGATCTGCCGACCTCTGGGAGAAATCCA					
T T L L L F L F H S E Z T I C A P S G R M M S					
130	140	150	160	170	180
GCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAAACGAGACGACCTTCTATCTGAGGAACA					
S R M Q A F R I W D V N Q R T F Y L R N					
190	200	210	220	230	240
ACCAACTAGTTGCTGGATACCTGCAAGGACCAAAATGTCAATTTAGAAAGAAAGATAGATG					
N Q L V A G Y L Q G P N V N L E E K I D					
250	260	270	280	290	300
TGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCATGGGAGGAAGATGTGCTCTGT					
V V P I E P H A L F L G I H G G K M C L					
310	320	330	340	350	360
CCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGACGACGACTCCAGCTGGAGGCAATTAACACTCACTGACC					
S C V K S G D E T R L Q L E A V N I T D					
370	380	390	400	410	420
TGAGCGAGAACAAGAGCAGGACAAGCGCTTCCGCTTCATCCGCTCAGACAGTGGCCCCA					
L S E N R K Q D K R F A F I R S D S G P					
430	440	450	460	470	480
CCACCAGTTTGTAGTCTGCCGCGCTGCCCGGTTGGTTCCTCTCGACGCGATGGAAGCTG					
T T S F E S A A C P G W F L C T A M E A					
490	500	510	520	530	540
ACCAGCGCCTCAGCCTCACCAATATGCGCTGACGAAGCGCTCATGGTCAACCAAAATTCTACT					
D Q P V S L T K M P D E G V M V T K F Y					
550	560	570	580	590	600
TCCAGGAGGACGAGTACTGCTCCACAGGCGCTGCTGTTCCATTCTTGCATGGCAAGGACTG					
G Q E D E *					

の98位から557位までの核酸を包含する請求の範囲17記載の単離されたDNA配列。

(本頁以下余白)

9. 組換えDNA分子CT10-IL1i-2A。

20. 1L-11-X、1L-11- α および1L-11- β の少なくとも一つからなる実質的に精製されたインターロイキン-1インヒビター (1L-11)。

21. 前記 IL-1i が IL-1i-X である請求の範囲20記載のインターロイキン-1インヒビター。

22. 前記 11-1i が 11-1i- α である請求の範囲20記載のインターロイキン-1インヒビター。

23. 前記 11-1i が 11-1i-β である請求の範囲 20 記載のインターロッキング - 1 インヒビター。

24. 前記 DNA塩基配列が下記配列:

(本頁以下余白)

25. 下配配列：

M	E	I	X	R	G	L	R	S	H	L	:	T	L	L	L	F	L	F	H	30
S	E	T	I	X	Z	P	S	G	R	K	S	S	K	M	Q	A	F	R	I	20
W	D	V	N	Q	K	T	F	Y	L	R	N	N	Q	L	V	A	G	Y	L	50
Q	G	P	N	V	N	L	Z	E	K	I	D	V	V	P	I	E	P	H	A	30
L	F	L	G	I	H	G	G	K	M	X	L	S	X	V	K	S	G	D	E	100
T	R	L	Q	L	E	A	V	N	I	T	D	L	S	E	N	R	K	Q	D	120
K	R	F	A	F	I	R	S	D	S	G	P	T	T	S	F	E	S	A	A	140
X	P	G	W	F	L	X	T	A	M	E	A	D	Q	P	V	S	L	T	N	160
M	P	D	E	G	V	M	V	T	K	F	Y	F	Q	E	D	E				170

(式中Xはシステイン、セリンまたはアラニンであり、そしてZはアルギニンまたはプロリンである)を有する實質的に精製されたインターロイキン-1インヒビター。

インターロイキン-1インヒビター

発明の背景

本出願は、同一発明者による米国特許出願第238,713号、1988年8月31日出願、の一部継続出願であり、さらにこの米国特許出願第238,713号は米国特許出願第188,915号、1988年5月27日出願、の一部継続出願である。

A. IL-1

インターロイキン-1は単球およびいくつかのマクロファージを含む多数の細胞型により生産されるタンパク質のクラスである。このクラスには少なくとも2種の、インターロイキン-1アルファおよびインターロイキン-1ベータとして知られる17-18キログルトンタンパク質が含まれる。これらのタンパク質は炎症および免疫応答に関与する多数の様々な標的細胞に対して重要な生理学的作用を及ぼす。このタンパク質はT細胞に対するコマイトジェン（フィトヘマグルチニンとともに作用する）であり、線維芽細胞および軟骨細胞の両者に非活性化型コラゲナーゼの分泌を引き起こさせそして好中球に対する内皮細胞の表面粘着力を増加させる。さらに、インターロイキン-1は

細胞からの酵素放出を刺激することによって組織破壊を媒介できる。ライター症候群の関節病理は乾癆性関節炎および慢性関節リウマチでみられる病理と同様である。IL-1はこれら3種の異なる炎症性関節炎形態における組織破壊のメジエーターとして関わっている。さらに、骨関節炎患者の滑液中にIL-1が見出されうる。軟骨細胞によるIL-1の放出はこの疾患における関節軟骨の破壊に関与している。

また、IL-1は自己免疫疾患を重くしうる。例えば、全身性エリテマトーデスにかかった人物の末梢血液細胞からのIL-1生産の減少が記載されている。さらに、Bリンパ球機能のいくつかの変化はIL-1生産またはIL-1利用可能性の異常と関連しているのかもしれない。

硬皮症患者の末梢単球におけるIL-1の過剰生産が示されており、線維芽細胞によるコラーゲン生産を刺激することによって線維症を起こし得る物質としてIL-1が関与している。また皮膚筋炎における組織損傷のメカニズムも細胞性免疫に関わっている可能性があり、したがってIL-1はこのような病理生理学的過程にメジエーターとして関わっているのであろう。

急性および慢性の関節性肺炎はIL-1が刺激しうる肺線維芽細胞による過剰なコラーゲン生産を特徴とする。肺高血圧症の動物モデルに関する最近の研究では、肺動脈の狭窄をもたらす内皮細胞の変化がIL-1によ

バイロジェンとして視床下部に作用し、筋内タンパク質の異化作用を刺激し、そして肝細胞に「急性期反応体」として知られるある種のタンパク質の合成を惹起させる。したがって、インターロイキン-1 (IL-1)が感染および創傷に対する生体応答の重要な一部であることは明白である。

B. IL-1の病理学的役割

しかしながら、IL-1は通常は有益に作用するにも関わらず、IL-1の作用が有害となるような状況が明らかになった。例えば、IL-1は関節炎にかかった関節内でのコラゲナーゼレベルを増加させることができ、そして慢性関節リウマチにおける急性期および慢性期の両方の免疫病理のメジエーターとして関わっている。IL-1は内皮細胞機能を変化させ、白血球およびリンパ球の滑膜組織への化学定性および移動を指示し、毛細管増殖を誘導し、そして本疾患の急性期の滑膜被覆におけるマクロファージの蓄積を刺激することができる。組織破壊の段階では、IL-1は線維芽細胞および軟骨細胞からの酵素放出を刺激することによって組織損傷におけるメジエーターとして関与している。

さらに、乾癆患者の皮膚に於けるIL-1の過剰生産が明らかとなっており、乾癆性関節炎患者の滑液中では高レベルのIL-1が見出されうる。乾癆性関節炎で炎症を起こした滑膜の細胞によって放出されたIL-1は、他の

誘導される可能性のあることが示される。肺高血圧症およびさらに二次的な損傷を引き起こすのはこの狭窄である。従って、IL-1インヒビターはこれらの肺炎患者の治療に有用であろう。

最近の研究で示されるように、IL-1はインスリンの生産を担うランゲルハンス島のベータ細胞を直接的に害することができる。現在その細胞に対するIL-1による損傷が若年性糖尿病の急性期に於ける初発事象であるとの仮説がたてられている。

急性および慢性糸球体腎炎の多くの型においては、腎臓に於ける単球およびマクロファージの浸潤が主にみられる。これらの細胞からのIL-1の放出が他の炎症性細胞の局所的な蓄積を引き起こして、結局は腎臓における炎症性損傷および線維形成反応をもたらす。

痛風および偽性痛風の組織または関節液中に見いだされる結晶はマクロファージによるIL-1放出を直接刺激できることが示されている。したがって、IL-1はこれらの疾患の炎症性サイクルにおいて重要なメジエーターであろう。

IL-1は骨からのカルシウムの損失を惹起することができ、そして炎症性関節炎にみられるオステオポロシスの原因であろう。

乾癆患者由来のケラチン細胞は大量のIL-1を放出する。このメジエーターはこの疾患患者の皮膚に生じる

二次的細胞増殖および害種の原因であろう。

IL-1は重要な内因性パイロジェンの一つであり、そして細菌またはウイルスによる急性の熱性病気のようないくつかの感染性疾患でみられる著しい発熱を引き起こすのであろう。

サルコイドーシスは、身体の数多くの様々な器官に於ける肉芽腫性疾患を特徴とする。IL-1はインビトロで肉芽腫形成を誘導しうることが示されており、サルコイドーシス患者のこのような過程に関与している可能性がある。

クローン病および潰瘍性大腸炎由来の末梢単球に於いてはいずれもIL-1の過剰生産が示されている。腸内における局所的なIL-1放出は、これら疾患の炎症性サイクルを刺激する重要なメジエーターであらう。

ある種のリンパ腫は、発熱、オステオポロシスおよびさらに二次的な関節炎さえも特徴とする。いくつかのリンパ腫細胞による過剰なIL-1の放出がインビトロで明らかになっており、これら悪性腫瘍の臨床的な徴候のいくつかの原因でありうる。また、一部の悪性リンパ腫によるIL-1生産によって、白血球でみられる発熱、急性期応答および悪液質の一部が引き起こされる可能性がある。

脳のアストロサイトによるIL-1放出が脳損傷後の血管閉塞から生じうる線維症誘発の原因であると考えら

れる。

C. IL-1インヒビターの用途

IL-1が有害な作用を有する上記のようなまたは他の状況に於いては、IL-1作用のインヒビターには明らかに臨床上の用途が存在する。IL-1はT細胞に対するコマーサイトジェンであるため、自己免疫疾患および他の免疫疾患の発症の主因である。したがって、全身に投与されれば、IL-1インヒビターは有用な免疫抑制剤となり得る。局所適用ではかかるIL-1インヒビターは、炎症を起こした関節内や他の炎症部位における組織破壊を阻止することができよう。事実ある種のIL-1インヒビターはコラゲナーゼインヒビターとともに投与された場合、組織破壊を防げるのにさらに効果的であらう。

合成、分泌、またはIL-1に対する標的細胞の結合あるいは応答のレベルで、IL-1作用に対する治療的介入が可能であらう。IL-1はリポ多糖類、補体フラグメントおよびウイルスに反応して単球/マクロファージおよび他の細胞により合成される。これらの誘導因子が産生細胞に結合するのを阻止する任意の分子、あるいはこれら細胞の生理に及ぼすそれらの作用を妨害する任意の分子がIL-1作用の調節物質として役立つであらう。IL-1タンパク質の少なくとも2種の30kd前駆体をコードするmRNAが単離されたが、このものは疎水性シ

グナル配列を含まないため、通常の分泌系によってはIL-1は分泌されない。不活性前駆体からの活性タンパク質の放出にはおそらく前駆体のタンパク分解が必要である。1ないしそれ以上のIL-1を前駆体から放出することに対するインヒビターは、理論上はIL-1の作用を制御するはずである。IL-1はおそらく古典的なレセプター（そのようなレセプターはまだ単離されていないが）を介する経路によって標的細胞に作用する。したがって、レセプターへのIL-1の結合を妨げ、またはこのレセプターをダウンレギュレートする分子は、IL-1の作用をも調節できよう。さらに、IL-1のレセプター結合に続いて細胞内で生起する事象は未だ完全にはわからないが、レセプターで媒介される他の事象に対する細胞の応答を防げそしてそれゆえにIL-1の作用を阻止しうる物質が存在する可能性がある。以上述べた理由から、上記様式の一またはそれ以上でIL-1を阻害しうるタンパク質および小分子が探索されている。

驚くべきことに、本発明者らはIL-1阻害性質を有する少なくとも2種のIL-1インヒビタータンパク質を見出した。これらの分子は精製型で得られており、当業者がそのアミノ酸配列を決定できよう。さらに、これらのタンパク質を生産する細胞標品が特性決定されており、そしてその合成をもたらしmRNAが特性決定されている。最後に、これらインヒビターをコードする遺

伝子に関するcDNA発現ライブラリーのスクリーニングを容易にするであろう抗血清が開発されている。これらの物質を一緒に用いることによってIL-1インヒビターをコードするcDNAのクローニングが可能となろう。これらの遺伝子は次にIL-1により媒介される病理生理学的症状の治療に有用な医薬製剤における使用に適したIL-1インヒビターの大規模生産を可能にしよう。

発明の要約

本発明は一般的にはIL-1インヒビター（"IL-1i"）に関し、そしてより詳細には単球由来IL-1インヒビターに関する。さらに、本発明はこれらインヒビターの生物学的に活性な類似体にも関する。

本発明の目的は、IL-1 α またはIL-1 β 、またはその組合せ物に対して活性な精製型IL-1インヒビターを提供することにある。本発明のもう一つの目的は、これらのインヒビターを精製型で提供して、それらのアミノ酸配列の決定を可能にすることである。さらに他の目的は、特定のIL-1インヒビターのアミノ酸配列を提供することである。さらに、このようなIL-1インヒビターより強いまたは同等な性質を有する生物学的に活性な類似体を同定することも本発明の目的の一つである。

さらに、ここに述べたIL-1インヒビター生産のための組換えDNA系を提供することも本発明の目的である。

本発明のさらに他の目的には、IL-1に対して活性を示す医薬製剤として価値があらう精製型IL-1インヒビターを提供することも包含される。

本発明の他の目的および利点は一部は以下の説明文中で述べるが、また一部はその記述から明白であるかあるいは本発明の実施から学ぶことができよう。特に添付の請求の範囲に示した手段およびその組合せによってこれら目的および利点が実現され達成されよう。

これら目的を達成するために、そして本発明の目的にしたがって、IL-1に対して阻害活性を示すIL-1インヒビターを開示する。好ましいインヒビターはIgG被覆プレート上で増殖させた単球を用いる単球-馴化培地から精製形で単離されている。

本発明の好ましいインヒビターには、1、2、および3がある。インヒビター1および2はSDS-PAGE上で22-23kDaタンパク質に特徴的な位置に移動し、特定の条件下でMono Q PPLCカラムからそれぞれ52mMおよび60mM NaClで溶出するタンパク質である。インヒビター3はSDS-PAGEで20kDaタンパク質に特徴的な位置に移動し、特定の条件下でMono Q PPLCカラムから48mM NaClで溶出するタンパク質である。さらに、目的を達成するために、そして本発明の目的にしたがって、活性成分の少なくとも1種である本発明によるIL-1インヒビターまたは本文に述べる生物学的に活性なその類

似体を含有する医薬組成物が開示される。

さらに、目的を達成するために、そして本発明の目的にしたがって、これらのIL-1インヒビターおよびその類似体を生成させるための組換えDNA系も開示される。この系の好ましい態様には、本文中に開示されるIL-1インヒビターを発現できる発現系を構成するベクターおよび細胞とともに、少なくとも1種のIL-1インヒビターをコードする少なくとも一種のcDNAクローンまたはその合成同等物が包含される。これらのcDNAクローンを同定するのに用いられる抗血清も提供される。これらcDNAクローン、その類似体、またはこれらインヒビターをコードする他のDNA配列を用いるこれらIL-1インヒビター生産のための発現系も提供される。

図面の簡単な説明

第1a図および第1b図は二種の代謝標識された単球上清のMono Qクロマトグラフィーのタンパク質プロファイルを示す。細胞はIgG(1a)またはウシ胎児血清(1b)を被覆したプレート上で培養した。

第2a図は、第1a図および第1b図に示される領域からのフラクションの銀染色ゲルを示す。

第2b図は、第2a図に示されるゲルのオートラジオグラムである。

第3a、bおよびc図は実施例1の精製IL-1iに関するデータを示す。第3a図は放射能パターンを重ね

たクロマトグラフィーデータを示す。第3b図は第3a図に示したフラクション試料に行った銀染色ゲルを示す。第3c図は第3b図のゲルのオートラジオグラムを示す。

第4aおよび4b図は、Mono Q精製IL-1iのゲル透過クロマトグラムの結果を示す。

第5aおよび5b図はマウス抗血清のウェスタン分析を示す。

第6図はプラスミドpSVXVPL2IL-1iの作製を示す。

第7図はプラスミドpMK-SGE:IL-1iの作製を示す。

第8a-d図はIL-1i-αに関するデータを示す。第8aおよび8b図はクロマトグラフィーデータを示す。第8c図は第8b図に示されるフラクション試料に対して行った銀染色ゲルを示す。第8d図はオートラジオグラムを示す。

第9aおよび9b図はIL-1i-βに関するデータを示す。第9a図はクロマトグラフィーデータを示す。第9b図はSDS-PAGEデータを示す。

第10図はIL-1i-αのペプチド分離データを示す。

第11図はIL-1i-βのペプチド分離データを示す。

第12a図は実施例6による電気泳動後にEcoRI消化したGT10-IL1i-2Aのゲルの写真である。

第12b図は第12a図に示されるゲルのサザンブロットのオートラジオグラムデータを示す。

第13図は、実施例6によるラムダGT10-IL1i-2Aのタンパク質コード領域のDNA配列および予想アミノ酸配列の一部を示す。

第14図はGT10-IL1i-2Aのヌクレオチド配列を示す。

第15図は特にIL-1i配列および分秘リーダー配列を含むペプチドを示す。

好ましい実施態様の記載

ここでは現在好ましい本発明の実施態様に対する記載を詳細に行うこととするが、この記述は以下の実施例と一緒に本発明の原理を説明するものである。A. ヒト単球由来インヒビター

前記したとおり、本発明は精製形で単離されているIL-1インヒビターに関する。IgGで被覆した容器で単球を増殖させたヒト単球馴化培地から、本発明のIL-1インヒビターを得ることが好ましい。さらに、本発明はヒト単球含有培地由来インヒビターと生物学的に同等な任意の起源の実質的に精製されたIL-1インヒビターを包含する。

本明細書および請求の範囲を通じて用いられている「生物学的に同等な」なる表現は、単球から単離された天然型IL-1インヒビターと同様の様式でIL-1作用を阻害することのできる（必ずしも同程度にというわけではない）本発明の組成物を意味する。本明細書および請求の範囲を通じて用いられている「実質的に相同

な」とは、単球馴化培地から単離された天然型 IL-1 インヒビターに対する、既に報告され任意の IL-1 インヒビターにより示される以上の相同性の度合いを意味する。70%以上の相同性の度合いが好ましく、80%以上がより好ましく、そして90%以上がさらにもっと好ましい。特に好ましい一群のインヒビターは天然型インヒビターと95%以上相同である。ここで述べた相同性のパーセンテージは、比較すべき配列内で同一のアミノ酸残基をそろえて並べたふたつの配列の小さいほうにみられるアミノ酸残基のパーセンテージとして算出される。この場合、Dayhoff, M.D.がAtlas of Protein Sequence and Structure第5巻、124ページ(1972)、National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C. (参考として詳細にここに編入される)に示されるように、このような比較のための配列を助けるために100アミノ酸の長さの4個のギャップを導入することができる。

本発明の好ましい IL-1 インヒビターは単球馴化培地から得られ、初めて精製型で単離された。本出願の目的にとって、本文中で開示される IL-1 インヒビターを指すのに用いられる場合「純粋型」または「精製型」とは、IL-1 インヒビタータンパク質以外のタンパク質を實質的に含まない製品を意味する。本発明の IL-1 インヒビターは少なくとも90%純粋であることが好まし

く、95%純粋であることがさらに好ましい。

実施例の方法により少なくとも3種類の精製 IL-1 インヒビターが単離されている。これらにはインヒビター I、インヒビター 2 およびインヒビター 3 が包含される。インヒビター 1 は SDS-PAGE で 22-23kDa 分子と同様の挙動を示し、約 4.8 の等電点を有し、そして Tris 緩衝液、pH 7.8 中 52mM NaCl 付近で Mono Q FPLC カラムから溶出する。インヒビター 2 も 22-23kDa タンパク質で $pI=4.8$ であるが、Mono Q カラムからの溶出は 60mM NaCl である。インヒビター 3 は 20kDa タンパク質で、48mM NaCl で Mono Q カラムから溶出する。インヒビター 1、2 および 3 は免疫学的、機能的に関連性がある。これらのインヒビターを精製型で得たことによって、本発明者らはそれらのアミノ酸配列を得ることができた。本文中で初めて明らかに示された精製インヒビター、および ABI プロテイン シークエンサー テクニカル マニュアル (ABI Protein Sequencer) 中に記載されたような方法を用いて、これらのインヒビターのアミノ酸配列の實質的な割合を推定することができる。

実施例 3 は 3 種の IL-1 インヒビター、すなわち IL-1 β -X、IL-1 β - α および IL-1 β - β について得られたアミノ酸配列データを示す。

本発明者らは IL-1 インヒビターに対して生成された

少なくとも 1 種の抗体を発現した。当業者に知られた方法により、この IL-1 インヒビターおよびその他の IL-1 インヒビターに対する別のポリクローナルおよびモノクローナル抗体を調製することができる。特定のポリクローナル抗体の一つを実施例 4 に説明する。

B. 組換えインヒビター

1. 概説

IL-1 インヒビター製造のための組換え DNA 法をここに示す。本発明の一実施態様に於ては、その活性部位はヒトから単離された天然型 IL-1 インヒビターと生物学的に同等に機能する。IL-1 インヒビター生産する指示するために、天然または合成 DNA 配列を用いることができる。この方法は以下を含んでなる：

(a) 宿主細胞に指示して IL-1 インヒビター活性を有するタンパク質を生産させることのできる DNA 配列の調製；

(b) 例えばその DNA 配列を発現するのに必要な操作エレメントを含有するベクターのような、宿主細胞に移入および複製せられるベクター中への DNA 配列のクローニング；

(c) 合成 DNA 配列および操作エレメントを含有するベクターの IL-1 インヒビターをコードする DNA を発現しうる宿主細胞への移入；

(d) ベクターの増幅およびインヒビターの発現に

適した条件下での宿主細胞の培養；

(e) インヒビターの収穫；および

(f) 得られたインヒビターに、活性型の 3 次構造をとらせ、それにより IL-1 阻害活性を有するものとなす。

2. DNA 配列

本方法における使用が意図される DNA 配列を、一部は実施例 5 で、また一部は実施例 6 で検討する。これらの配列は合成および天然の DNA 配列を包含することが意図される。天然型配列にはさらに cDNA またはゲノム DNA セグメントが包含される。

実施例 6 は実施例 1-3 で単離されたものと同一のタンパク質をコードする DNA の分子クローンを提供する。実施例 6 に於ては、ブランク、GT10-IL-1 β -2A、を GT10 ライブラリーから単離した。このブランク内のフェージを増殖させ、その DNA を単離しそして EcoRI で消化した。1850塩基対の EcoRI フラグメントは IL-1 インヒビターのコード配列を担持している。第13図はこの EcoRI フラグメントの部分的な DNA 配列を示す。

本分に含まれる教示および公知の方法に鑑みて、当業者は他の合成ポリヌクレオチド配列を利用することができよう。ポリヌクレオチド合成に関する業界の近況の例として、Matteucci, M.D. および Ceruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103:3185(1985) および

Beaucage, S.L. および Caruthers, M.H., Tetrahedron Lett. 22:1859(1981)、および ABI オリゴヌクレオチドシンセサイザーとともに供給される使用説明書を示す。これらはそれぞれ参考として詳細にここに繰入される。

これら合成配列は以下に詳述する天然型配列と同一であってもよいし、また異なるヌクレオチドを含有することもできる。ある実施態様に於ては、もし合成配列が本発明の天然型 DNA 配列中に見いだされるのとは異なるヌクレオチドを含有する場合、これらの異なる配列は単球から単離された IL-1I と同じ一次構造を有するポリペプチドをなおコードしていることが意図される。あるいはまた別の実施態様に於ては、異なるヌクレオチドを含有する合成配列はここで述べた IL-1I と同じ生物活性を有するポリペプチドをコードしている。

さらに、その DNA 配列は天然型配列のフラグメント、すなわち天然に存在し、本発明者らによって初めて単離および精製されたポリヌクレオチドのフラグメントであってもよい。ある実施態様に於ては、その DNA 配列は cDNA ライブラリーから単離された制限フラグメントである。

別の実施態様に於ては、その DNA 配列はヒトゲノムライブラリーから単離される。この実施態様に有用な

かかるライブラリーの例は、Lawnら、Cell 15:1157-1174(1978)により示され、この文献は参考としてここに詳細に繰入される。

この実施態様の好ましい形に於ては、天然型 DNA 配列は以下からなる方法によって得られることが意図される。

(a) cDNA の全体または一部を増幅および発現することができるベクターおよび細胞内で IL-1 インヒビターを生産しうる細胞、好ましくは単球からのヒト cDNA ライブラリーの調製；

(b) IL-1 インヒビター遺伝子またはそのタンパク質産物と結合することのできる少なくとも 1 種のプローブを用いるヒト DNA ライブラリーの探索；

(c) クローンがインヒビター遺伝子またはそのタンパク質産物に関する少なくとも 1 種のプローブと結合する能力に基づき、インヒビターをコードする遺伝子を含有する少なくとも 1 種のクローンの同定；

(d) 選択したひとつのまたは複数のクローンからのインヒビターをコードする遺伝子またはその遺伝子の一部分の単離；

(e) その遺伝子または遺伝子の好適なフラグメントを、当該遺伝子を宿主細胞内に維持しこれを発現するのに必要な操作エレメントに結合させる。

上述の方法に有用な天然型 DNA 配列は、以下を含ん

でなる方法によっても同定および単離することができる：

(a) 好ましくは recArecBC E. coli 宿主内で増幅される、ヒトゲノム DNA ライブラリーの調製；

(b) IL-1 インヒビター遺伝子またはそのタンパク質産物と結合できる少なくとも 1 種のプローブを用いる、ヒトゲノム DNA ライブラリーの探索；

(c) クローンがインヒビター遺伝子またはそのタンパク質産物に関する少なくとも 1 種のプローブと結合する能力に基づき、インヒビターをコードする遺伝子を含有する少なくとも 1 種のクローンの同定；

(d) 同定された一つのまたは複数のクローンからのインヒビターをコードする遺伝子の単離；

(e) その遺伝子または遺伝子の好適なフラグメントを、当該遺伝子を宿主細胞内に維持しこれを発現するのに必要な操作エレメントに結合させる。

上記の方法での使用に適した天然型 DNA 配列の単離には、適当な遺伝子またはその遺伝子のセクションの末端部の中およびそのもっとも近くにある二つの制限部位を同定するのが好ましい。つぎに適当な制限エンドヌクレアーゼを用いて、適当な遺伝子を含有する DNA セグメントを残りのゲノム物質から切り出す。切り出し後、DNA 配列の 3' および 5' 末端および任意のエキソン結合を再構築して、IL-1 インヒビタータンパク

質の N- および C- 末端をコードでき、かつその DNA 配列がその操作エレメントに融合させうる適当な DNA 配列を提供する。

3. ベクター

(a) 微生物、特に E. coli

本発明での使用が意図されるベクターには、任意の好ましいかまたは必要な操作エレメントとともに上記の DNA 配列を挿入することができる任意のベクター、そしてそのベクターは次に宿主細胞に移入されてその細胞内で複製することができるベクターが包含される。好ましいベクターは、その制限部位がよく実証されており、かつ DNA 配列の転写に好ましいかまたは必要な操作エレメントを含有するベクターである。しかしながら、本発明のある種の実施態様は、ここに記載される cDNA 配列のひとつまたはそれ以上を含有していよう現在未発見のベクターを使用することも想定している。特に、これらのベクターの全てが次の特徴のいくつかまたは全てを有することが好ましい。すなわち(1)宿主生物配列の最小数を保有する、(2)所望の宿主中で安定に維持され増殖される、(3)所望の宿主中に多くのコピー数で存在できる、(4)関心のある遺伝子の転写を促進するために配置された調節可能なプロモーターを有する、(5) DNA 配列が挿入される部分と別のプラスミドの一部分上に存在する選択可能な特色をコードする少な

くとも1種のマーカー DNA配列を有する、および(6)転写を終止することができるDNA配列。

種々の好ましい実施態様においては、本発明の DNA配列を含有し発現することができるこれらのクローニングベクターは種々の操作エレメントを含有する。これらの“操作エレメント”は、ここに考察されているように少なくとも1種のプロモーター、少なくとも1個のシャイン-ダルガノ配列および開始コドン、および少なくとも1種の終止コドンを含む。好ましくは、これらの“操作エレメント”はまた少なくとも1種のオペレーター、細胞内空間から搬出されるタンパク質のための少なくとも1種のリーダー配列、調節タンパク質のための少なくとも1種の遺伝子、およびベクター DNAの適切な転写およびそれに続く翻訳に必要なまたは好ましい任意の他の DNA配列をも包含する。

ある種のこれらの操作エレメントは本発明の好ましいベクターのそれぞれに存在できる。当業者に知られた方法を使用して、特にここに記載の教示にかんがみて、必要とされる任意の付加的な操作エレメントをこれらのベクターに加えることも意図される。

実際、容易に単純し、組み立てそして相互交換が可能な方法でこれらのベクターのそれぞれを構築することが可能である。それによりこれらのエレメントおよび DNA配列のコード領域の組合せからの数々の機能的

遺伝子の組立てが容易になる。さらに、これらのエレメントの多くは1種以上の宿主に適用されよう。ある種の好ましい実施態様においては、ベクターはレギュレーター(“オペレーター”)として機能できるDNA配列、およびレギュレータータンパク質をコードできる他のDNA配列を含有することもさらに意図される。

(i) レギュレーター

ひとつの実施態様においては、これらのレギュレーターはある種の環境条件の存在下で DNA配列の発現を阻止し、そして他の環境条件の存在下においては DNA配列によりコードされるタンパク質の転写およびそれに続く発現を可能にしよう。特に、調節セグメントを例えばイソプリルチオ- β -D-ガラクトシドの非存在下で DNA配列の発現が起こらないかまたは非常に減少した程度でしか起こらないような様式でベクターに挿入するのが好ましい。この状況において、DNA配列を含有する形質転換微生物はIL-11の発現開始前に所望の密度で増殖できる。この実施態様においては、所望のタンパク質の発現は、所望の密度で達成された後にその DNA配列の発現を生じることができる物質を微生物の環境に添加することにより誘導される。

(ii) プロモーター

発現ベクターはそれ自体のタンパク質発現のために宿主生物により使用されうるプロモーターを含有しな

ければならない。ラクトースプロモーター系が一般に使用されるが、他の微生物のプロモーターが単離され、特性決定されており、それにより、当業者が組換えIL-11の発現のためにそれらを使用することが可能となった。

(iii) 転写ターミネーター

ここで意図される転写ターミネーターは、ベクターを安定化するのに役立つ。特に Rosenberg, M. および Court, D., Ann. Rev. Genet. 13:319-353 (1979) (ここに参考文献としてとり込まれる)に記載されている配列が本発明における使用を意図される。

(iv) 非翻訳配列

好ましい実施態様においては、3'または5'非翻訳配列を遺伝子転写物に組み込むのを可能にするためにコード領域の3'または5'末端を再構築することも望ましかろうことが注目される。これら非翻訳配列中に包含されるものは、ここに参考文献として導入される Schmelssner, U., McKenney, K., Rosenberg, M. および Court, D. の J. Mol. Biol. 176:39-53 (1984) により同定された mRNA を安定化する配列である。

(v) リボソーム結合部位

外来タンパク質の微生物による発現はリボソーム結合部位を包含するがそれらに限定されないある種の操作エレメントを必要とする。リボソーム結合部位は、

Gold, L. ら, Ann. Rev. Microbio. 35: 557-580 または Marquis, D.M. ら, Gene 42:175-183 (1986)に記載されるように、タンパク質合成の開始においてリボソームが認識して結合する配列である。これらの文献は参考としてここに導入される。好ましいリボソーム結合部位はGAGGCGCAAAA(ATG)である。

(vi) リーダー配列および翻訳カプラー

さらに、もしタンパク質が細胞質から排出される場合は適切な分泌リーダー(シグナル)配列をコードする DNAが Watson, M.E. により Nucleic Acids Res. 12:5145-5163に記載されているように(この文献は参考としてここにとり込まれる) DNA配列の5'末端に存在することが好ましい。リーダー配列の DNAは、リーダー配列がインヒビターにじかに隣接しかつ共有結合している融合タンパク質の生産を可能にする位置になければならない、すなわち2つの DNAコード配列の間には転写または翻訳終止シグナルが存在してはならない。リーダー配列の存在は一部には下記の理由のひとつまたはそれ以上のために所望される。第一に、リーダー配列の存在はIL-11の宿主プロセッシングを容易にしよう。特に、リーダー配列はリーダーペプチダーゼによる最初の翻訳産物の切断を指示し、リーダー配列を取り除き、そして有効なタンパク質活性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを残すことができる。

第二に、リーダー配列の存在はIL-Iを細胞の細胞質の外に導くことにより、そのタンパク質の精製を容易にすることができる。宿主微生物のいくつかの種においては、適切なリーダー配列の存在により、いくつかのエシェリヒア・コリ(*E. coli*)の場合におけるように、完成したタンパク質を細胞周辺腔へ移送するのを可能にするであろう。ある種の*E. coli*、サッカロミセス(*Saccharomyces*)およびバチルス(*Bacillus*)およびシュードモナス(*Pseudomonas*)株の場合、適切なリーダー配列により、タンパク質が細胞膜を通過して細胞外の培地に入る移送が可能となろう。この状況において、タンパク質は細胞外タンパク質から精製されうる。第三に、本発明により調製されたいくつかのタンパク質の場合、リーダー配列の存在は完成したタンパク質をそれが適切なタンパク質活性を有するその活性構造をとるために折り重なりうる環境に置くのに必要でありうる。

本発明のひとつの好ましい実施態様においては、付加的なDNA配列が、IL-IインヒビターをコードするDNA配列のすぐ前に位置している。この付加的なDNA配列は翻訳カプラーとして機能できる。すなわちそのDNA配列はRNAをコードしており、そのRNAは自分が連続するインヒビターRNAのリボソーム結合部位に直接隣接してリボソームの位置設定する役割をする。本発明

するのを阻止するのに有用でありうる。この実施態様においては、形質転換された宿主微生物の純粋な培養物は、その誘導された表現型が生存にとって必要であるような条件のもとで微生物を培養することにより得られよう。

ここで考察されているように操作エレメントは先行文献およびここに含まれる教示を考慮して当業者によりルーチンに選択される。これらの操作エレメントの一般例は、ここに参考として導入されるB. Lewin, Genes, Wiley & Sons, New York (1983)に記載されている。好適な操作エレメントの種々の例は上記考察したベクターに見い出され、前記ベクターの基本的特徴を論議している刊行物を参照することにより明らかとなろう。

上記したベクターの必要かつ所望の全ての構成部分が合成および単離されると、ベクターは当業者に一般に知られている方法により組立てられる。かかるベクターの組立ては、当業者が行なう職習の範囲内であると思われ、そのようなものであるので、過度の実験を伴わずに行なうことができる。例えば、Maniatis, T.ら、Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratories, N.Y. (1984)に記載されているように、同様のDNA配列が適切なクローニングベクターに連結されており、この文献は参考としてここに導入される。

のひとつの実施態様においては、DNA配列TAACGAGGCC CAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATCTTCGAGGATGATTAAATGおよび翻訳カプラーに関連した当業者に現在知られた方法を用いて翻訳カプラーを誘導することができる。

(v) 翻訳ターミネーター

ここで意図される翻訳ターミネーターはmRNAの翻訳を停止させるのに役立つ。それらはKohli, J., Mol. Gen. Genet. 182:430-438に記載されるような天然のものであるか、またはPettersson, R.F., Gene 24:15-27(1983)に記載されるような合成されたものであることができ、これら両文献はここに参考文献として導入される。

(vi) 選択可能マーカー

さらに、クローニングベクターは薬剤耐性マーカーまたは宿主微生物により選択可能な特徴の発現を生じる他のマーカーのような選択可能なマーカーを含有するのが好ましい。本発明のひとつの実施態様においては、アンピシリン耐性遺伝子がベクターに包含される一方、他のプラスミドにはテトラサイクリン耐性またはクロラムフェニコール耐性遺伝子が包含される。

かかる薬剤耐性または他の選択可能なマーカーは、一部は形質転換体の選択を容易にすることが意図される。さらに、クローニングベクター中におけるかかる選択可能マーカーの存在は混入微生物が培地中で増殖

本発明のクローニングベクター構築においては、DNA配列およびそれに付随する操作エレメントの多数のコピーを各ベクターに挿入できることにも注目すべきである。かかる実施態様においては、宿主生物はベクター当り、所望のIL-Iインヒビターをより多量に生産しよう。ベクターに挿入されうるDNA配列の多コピーの数は生じたベクターが、そのサイズゆえによる、適切な宿主細胞に移され、複製されそして転写されるその能力によってのみ限定される。

(b) その他の微生物

*E. coli*以外の微生物中での使用に適するベクターも本発明において意図される。かかるベクターを第1表に記載する。さらに、ある種の好ましいベクターを下記に論ずる。

(本頁以下余白)

第 1 表

宿 主	細胞株	培 基	培 基	培 基	培 基
E. coli	Lac ⁺ Lac ⁻ Trp ⁺ Trp ⁻	1% 葡萄糖 1% 乳糖 1% 甘油 1% 丙酮 1% 丁酮 1% 戊酮 1% 己酮 1% 庚酮 1% 辛酮 1% 壬酮 1% 癸酮 1% 十一酮 1% 十二酮 1% 十三酮 1% 十四酮 1% 十五酮 1% 十六酮 1% 十七酮 1% 十八酮 1% 十九酮 1% 二十酮	1% 葡萄糖 1% 乳糖 1% 甘油 1% 丙酮 1% 丁酮 1% 戊酮 1% 己酮 1% 庚酮 1% 辛酮 1% 壬酮 1% 癸酮 1% 十一酮 1% 十二酮 1% 十三酮 1% 十四酮 1% 十五酮 1% 十六酮 1% 十七酮 1% 十八酮 1% 十九酮 1% 二十酮	1% 葡萄糖 1% 乳糖 1% 甘油 1% 丙酮 1% 丁酮 1% 戊酮 1% 己酮 1% 庚酮 1% 辛酮 1% 壬酮 1% 癸酮 1% 十一酮 1% 十二酮 1% 十三酮 1% 十四酮 1% 十五酮 1% 十六酮 1% 十七酮 1% 十八酮 1% 十九酮 1% 二十酮	1% 葡萄糖 1% 乳糖 1% 甘油 1% 丙酮 1% 丁酮 1% 戊酮 1% 己酮 1% 庚酮 1% 辛酮 1% 壬酮 1% 癸酮 1% 十一酮 1% 十二酮 1% 十三酮 1% 十四酮 1% 十五酮 1% 十六酮 1% 十七酮 1% 十八酮 1% 十九酮 1% 二十酮

20. Lin, C.-K., Quinn, L.A. Rodriguez, R.L. J. Cell Biochem. Suppl. 9B, p. 198 (1985).
21. Vasantha, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J., and Filpula, D. J. Bact. 159(3) 811-819 (1984).
22. Palva, I., Sarvas, M., Lehtovaara, P., Sibakov, M., and Kaariainen, L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5582-5586 (1982).
23. Wong, S.-L., Price, C.W., Goldfarb, D.S., and Doi, R.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).
24. Sullivan, M.A., Yasbin, R.E., and Young, F.E. Gene 29, 21-46 (1984).
25. Vasantha, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J., and Filpula, D. J. Bact. 159(3) 811-819 (1984).
26. Yansura, D.G. and Henner, D.J. PNAS 81, 439-443 (1984).
27. Gray, G.L., McKeown, K.A., Jones, A.J.S., Seeburg, P.H. and Heyneker, H.L. Biotechnology, 161-165 (1984).
28. Lory, S., and Tai, P.C. Gene 22, 95-101 (1983).
29. Liu, P.V. J. Infect. Dis. 130 (suppl), 594-599 (1974).
30. Wood, D.G., Hollinger, M.F., and Tindol, M.B. J. Bact. 145, 1448-1451 (1981).
31. St. John, T.P. and Davis, R.W. J. Mol. Biol. 152, 285-315 (1981).
32. Hopper, J.E., and Rowe, L.B. J. Biol. Chem. 253, 7566-7569 (1978).
33. Denis, C.L., Ferguson, J. and Young, E.T. J. Biol. Chem. 258 1165-1171 (1983).
34. Lutsdorf, L. and Megnet, R. Archs. Biochem. Biophys. 126, 933-944 (1968).
35. Mayhew, B., Bajwa, N., Rudolf, M. and Hinnen, A. EMBO. J. 5, 675-680 (1982).
36. Watson, M.E. Nucleic Acid Research 12, 5145-5164 (1984).
37. Gerband, C. and Guerinneau, M. Curr. Genet. 1, 219-223 (1-30).

1. Backman, K., Ptashne, M. and Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174-4178 (1976).
2. de Boer, H.A., Comstock, L.J., and Vasser, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25 (1983).
3. Shimatake, H. and Rosenberg, M. Nature 292, 128-132 (1981).
4. Derom, C., Gheysen, D. and Fiers, W. Gene 17, 15-51 (1982).
5. Halliwell R.A. and Entage, S. Gene 9, 27-47 (1980).
6. Grosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., and Noller, H. F., J. Mol. Biol. 148 107-127 (1981).
7. Normanly, J. Ogden, R.C., Horvath, S.J. and Abelson, J. Nature 321, 213-219 (1986).
8. Belaso, J.G., Nilsson, G., von Gabain, A. and Conen, S.N. Cell 46, 245-251 (1986).
9. Schmelssner, W., McKenney, K., Rosenberg M. and Court, D. J. Mol. Biol. 176, 39-53 (1984).
10. Mott, J.E., Galloway, J.L. and Platt, T. EMBO J. 4, 1887-1891 (1985).
11. Koshland, D. and Botstein, D. Cell 20, 749-760 (1980).
12. Movva, N.R., Kakamura, K. and Inouye, M. J. Mol. Biol. 143, 317-328 (1980).
13. Surin, B.P., Jans, D.A. Fimmel, A.L., Shaw, D.C., Cox, G.B. and Rosenberg, M.J. Bacteriol. 157, 772-778 (1984).
14. Sutcliffe, J.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3737-3741 (1978).
15. Peden, K.W.C. Gene 22, 277-280 (1983).
16. Alton, N.K. and Vapnek, D. Nature 282, 864-869 (1979).
17. Yang, M., Galizzi, A., and Henner, D. Nuc. Acids Res. 11(2), 237-248 (1983).
18. Wong, S.-L., Price, C.W., Goldfarb, D.S., and Doi, R.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).
19. Wang, P.-Z., and Doi, R.M. J. Biol. Chem. 259, 8619-8625, (1984).

(本页以下余白)

38. Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978).
39. Jabbar, M.A., Sivasubramanian, N. and Noyak, D.P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2019-2023 (1985).

(i) シュードモナスベクター

広範囲のグラム陰性細菌中で自律複製するいくつかのベクタープラスミドは、シュードモナス属の宿主中でクローニングベヒクルとして使用するのに好ましい。これらのある種のものは、Tait, R.C., Close, T.J., Lundquist, R.C., Haqiy, M., Rodriguez, R.L. および Kado, C.I., In Biotechnology, May, 1983, pp. 269-275; Panopoulos, N.J., Genetic Engineering in the Plant Sciences, Praeger Publishers, New York, New York, pp.163-185(1981); および Sakaguchi, K., Current Topic in Microbiology and Immunology 98:31-45 (1982)に記載されており、各文献は参考としてここに導入される。

ひとつの特に好ましい構築方法は、Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., Coleman, S. および Timmis, K.N., Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, Timmis, K.N. および Puhler, A. (編), Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979) (ここに参考として導入される)に記載されているように、プラスミド RSP1010 およびその誘導体を使用することであろう。RSP1010の利点は、それが *E. coli* およびシュードモナスの両種中に容易に形質転換されかつ安定的に維持される、比較的に小さくコピー数の多いプラスミドであることである。この系にお

いては、エシェリヒアについて記載されている *Tac* 発現系を使用することが好ましいであろう。なぜならば、*E. coli* *trp* プロモーターは、Sakaguchi, K., Current Topics in Microbiology and Immunology 98:31-45 (1982) および Gray, G.L., McKeown, K.A., Jones, A.J.S., Seeburg, P.H. および Heyneker, H.L., Biotechnology, Feb. 1984, pp.161-165 (両文献は参考としてここに導入される)に記載されるようにシュードモナス RNAポリメラーゼにより容易に認識されると思われるからである。転写活性はそのプロモーターを、例えば *E. coli* またはシュードモナス・エルギノサ (*P. aeruginosa*) *trp* プロモーターと交換することを要求することにより、さらに最大にすることができる。さらに、*E. coli* の *lacI* 遺伝子も調節を行うためにプラスミド中に包含されよう。

任意のシュードモナスタンパク質の翻訳開始ならびにインヒビターの細胞内発現を惹起させるために選択された種類の多量に発現される任意のタンパク質の開始部位に翻訳を結合できる。

宿主シュードモナス種の制限を欠く株が入手できない場合、*E. coli* から単離されたプラスミド構築物での形質転換効率は低い。したがって、Bagdasarian, M.ら、Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, pp.411-422, Timmis and Puhler (編),

Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979) (参考としてここにとり込まれる)に記載されているように、所望の宿主の形質転換前にシュードモナスクローニングベクターを、もうひとつの種の *r⁺m⁺* に継代させることが望ましい。

(ii) パチルスベクター

さらに、パチルス属の宿主において好ましい発現系には、クローニングベヒクルとしてのプラスミド pUB 110 の使用が包含される。他の宿主ベクター系におけるように、パチルス中で本発明の IL-1i を細胞内または分泌タンパク質のいずれかとして発現させることが可能である。本発明の態様には両方の系が包含される。パチルスおよび *E. coli* の両者の中で複製するシャトルベクターは、Dubnau, D., Gryczan, T., Contente, S. および Shivakumar, A.G., Genetic Engineering, Vol. 2, Setlow および Hollander (編), Plenum Press, New York, New York, pp.115-131 (1980) (参考としてここに導入される)に記載されるように、種々の遺伝子の構築および検査に利用できる。B. サブチリスからの IL-1i の発現および分泌のためには、アルファミラーゼのシグナル配列はそのタンパク質のコード領域に結合されるのが好ましい。細胞内インヒビターの合成には、移動性 DNA配列がアルファミラーゼリーダー配列のリボソーム結合部位に翻訳により結合されよ

う。

これらの構築物のどちらかの転写は、アルファミラーゼプロモーターまたはその誘導体により指示されのが好ましい。この誘導体は天然型アルファミラーゼプロモーターの RNAポリメラーゼ認識配列を含有するが、*lac* オペレーター領域も組み込んでいる。ペニシリナーゼ遺伝子プロモーターおよび *lac* オペレーターから構築された同様のハイブリッドプロモーターは、参考としてここに詳細に導入される Yansura, D.G. および Henner の Genetics and Biotechnology of Bacilli, Ganesan, A.T. および Hoch, J.A. (編), Academic Press, pp.249-263 (1984)に記載されるように調節可能な様式でパチルス宿主中で機能することが示されている。また *E. coli* の *lacI* 遺伝子もプラスミド中に包含されて調節を行うであろう。

(iii) クロストリジウムベクター

クロストリジウム中での発現に好ましい構築物の一つは、ここに参考として導入される J. Bacteriol. 159:460-464(1984)に記載の Heefner, D.L. らの方法により *C. パープリンジェンス* 中に形質転換された、ここに参考として導入される Squires, C.H. ら、J. Bacteriol. 159:465-471 (1984)に記載のプラスミド pJU12 である。転写はテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターにより指示される。翻訳は、他の宿主中

での使用に好適なベクターに関して上記に大要を記載した方法に厳密に類似している様式で、この同じtet^r遺伝子のシャイン-ダルガルノ配列に結合される。

(iv) 酵母ベクター

酵母に導入された外来 DNA の維持は、ここに参考として紹介される Botstein, D. および Davis, R.W., *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, Strathern, Jones and Broach (編), pp. 607-636 (1982) に記載されるいくつかの方法により行うことができる。サッカロミセス属の宿主生物で使用するのに好ましい発現系の一つは、2 ミクロプラスミド上に IL-1 遺伝子を含有する。2 ミクロサークルの利点には cir⁺ 株に導入された場合、比較的コピー数が高いことおよび高い安定性が包含される。これらのベクターは E. コリ内における複製と選択を可能にするために pBR322 からの複製開始点および少なくともひとつの抗生物質耐性マーカーを組み込むことが好ましい。さらにこのプラスミドは、2 ミクロ配列、および酵母の LEU2 欠損変異種において同じ目的を果すための酵母 LEU2 遺伝子を有することが好ましいであろう。

組換え IL-1 インヒビターを酵母中で最終的に発現させることを意図する場合、クローニングベクターをはじめに E. コリ中に移入し、そこでベクターが複製され、

有すべきであり、それによりこのベクターから転写された mRNA が適切にプロセシングされる。最後に、ベクターは E. コリ中において複製および選択が可能であるために、pBR322 からの複製開始点および少なくともひとつの抗生物質耐性を有しよう。

IL-1 インヒビターを生産する安定な細胞系を選択するためには、発現ベクターは薬剤耐性マーカーのような選択可能なマーカーの遺伝子を担持するまたは上記の Ausubel らにより記載される bhfr⁻ 細胞系を形質転換するためのジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) 遺伝子のような欠失細胞系の相補遺伝子を担持することができる。また選択可能なマーカーを担持する別のプラスミドを発現ベクターと共に形質転換することもできる。

4. 宿主細胞/形質転換

このようにして得られたベクターを適切な宿主細胞に移入する。これらの宿主細胞は微生物または哺乳動物細胞であることができる。

(a) 微生物

外来 DNA を取り込み、これらの遺伝子および付随する操作エレメントを発現する能力を有する任意の微生物を選択できると考えられる。宿主生物が選択された後、当業者 generally 知られている方法を用いてベクターを宿主生物に移入する。かかる方法の例は、ここに

それから増殖の後ベクターを得て複製することが好ましい。続いてベクターは IL-1 インヒビターの最終的発現のために酵母中に移入されよう。

(c) 哺乳動物細胞

IL-1 インヒビターの cDNA は、哺乳動物細胞中におけるそのインヒビター発現のための遺伝子として役立つであろう。そのものはここに参考として紹介される Kozak, *Nucleic Acids Research* 15:8125-8132 (1987) に記載されているようなリボソーム結合に効率のよい配列を有すべきであり、そして成熟タンパク質をプロセシングされた形態で細胞の外に導くためのリーダー配列 (3 (a)(vi) 項参照) をコードする能力を有すべきである。完全な cDNA 配列を担持する DNA 制限フラグメントは転写プロモーターおよびここに参考として紹介される Guarante, L., *Cell* 52:303-305 (1988) および Kadonaga, J.T. ら, *Cell* 51:1078-1090 (1987) に記載の転写エンハンサーを有する発現ベクターに挿入できる。もしインヒビターの構成的発現が細胞の増殖にとって有害である場合は、そのプロモーターはプラスミド pMSG (Pharmacia Cat. No. 27450601) におけるようにして調節可能であることができる。ベクターは、ここに参考として紹介される Ausubel, F.W. ら, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley (1987) に記載される完全なポリアデニル化シグナルを

参考として紹介される *Advanced Bacterial Genetics*, R.W. Davis ら, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1980) に見い出される。ひとつの実施態様においては、温度調節は、前記した操作エレメントの使用による遺伝子発現を調節する手段と考えられるので、形質転換は低い温度で起こることが好ましい。もうひとつの実施態様においては、もし浸透圧調節剤がベクターに挿入されている場合、形質転換中の塩濃度を調節は外来遺伝子の適切な制御を確実にするのに必要であろう。

宿主微生物は通性嫌気性または好気性であるのが好ましい。この方法において好ましく使用しうる特別の宿主には酵母および細菌が含まれる。詳細な酵母にはサッカロミセス属の酵母、特にサッカロミセス・セラビシエが含まれる。詳細な細菌には、バチルス属、エシェリヒア属およびシュードモナス属の細菌特にバチルス・サブチリスおよび E. コリが含まれる。他の宿主細胞は上記第 1 表に記載されている。

(b) 哺乳動物細胞

ベクターはリン酸カルシウム: DNA 同時沈降法、エレクトロポレーション、またはプロトプラスト融合法のようないくつかの技法により培養中の哺乳動物細胞に導入できる。好ましい方法は上記の Ausubel らにより記載されているリン酸カルシウムでの同時沈降であ

る。

形質転換可能で、cDNA配列の転写および翻訳、前駆体IL-11のプロセッシングおよび成熟タンパク質の分泌が可能で多くの安定な細胞型が存在する。しかしながら、分泌されたタンパク質のグリコシル化およびアミノ酸残基の翻訳後修飾に関して、もしそれがあるとすれば、細胞型によって異なる。したがって理想的な細胞型は天然型分子と同一の組換えIL-1インヒビターを生産する細胞型である。

5. 遺伝子工学的に作出された細胞の培養

宿主細胞をIL-1インヒビターの発現に適切な条件下で培養する。これらの条件は宿主細胞に一般に特異的であり、かかる生物の増殖条件に関し刊行された文献およびここに含まれる教示を考慮して当業者により容易に決定される。例えばここに参考として導入されるBergey's Manual of Determinative Bacteriology, 第8版, Williams & Wilkins Company, Baltimore, Marylandは細菌培養に関する情報を含有する。酵母および哺乳動物細胞の培養に関する同様の情報はここに参考として導入されるPollack, R. Mammalian Cell Culture, Cold Spring Harbor Laboratories (1975)から得られよう。

ベクター中に挿入されるかまたは存在する任意の操作エレメントの如何に応じてDNA配列の発現を調節す

微生物で発現されそしてそのタンパク質が細胞内もしくは膜を通してまたは細胞周辺腔に移送される際に、その適正な活性構造をとるであろう。もし適切なリーダー配列をコードするDNAが組換えタンパク質をコードするDNAに結合されている場合、これが一般に起こるであろう。もしIL-1インヒビターが、その適正な活性構造をとらない場合、形成された任意のジスルフィド結合および/または生じた任意の非共有相互作用は、例えば塩化 Guanidinium およびベータメルカプトエタノールのような変性剤および還元剤ではじめに破壊され、次いで希釈およびこれらの薬剤の制御された条件下での酸化に続きIL-1インヒビターがその活性構造をとることができよう。

再び折り重なる前および後の精製には、次の工程のいくつかの組合せを使用することが好ましい。すなわち陰イオン交換クロマトグラフィー (Mono QまたはDEAE-セファロース)、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superose)、等電点クロマトグラフィー (Mono P)、および疎水性相互作用クロマトグラフィー (オクチルまたはフェニルセファロース) である。特に価値のあるものうちでは、IL-11特異的モノクローナル抗体 (実施例3に記載) を使用する抗体アフィニティークロマトグラフィーであろう。

(b) 哺乳動物細胞から生産されたIL-11

るのに必要な任意の条件は、形質転換および培養段階で有効であろう。ひとつの実施態様においては、DNA配列の発現を阻害する適切な調節条件の存在下で、細胞は高い密度にまで増殖する。最適な細胞密度に近じた場合、環境条件をDNA配列の発現に適切な条件に変化させる。したがって、IL-1インヒビターの産生は宿主細胞の増殖が最適密度付近になった後の時間帯に起り、そして生じたIL-1インヒビターは、時としてはその発現に必要な調節条件が誘導された後に採取されるであろうことが意図される。

6. 精製

(a) 微生物から生成されたIL-11

本発明の好ましい実施態様においては、組換えIL-1インヒビターは採取の後でそれが活性構造をとる前に精製される。発明者らは、タンパク質がはじめに精製される場合は再び折りたたまれタンパク質を高収率で回収するのが容易になると考えるので、この実施態様が好ましい。しかしながら、ひとつの好ましい別の実施態様においては、IL-1インヒビターは精製の前に再び折り重なってその活性構造をとることができる。さらに他の好ましい実施態様においては、IL-1インヒビターは培地から回収される際そのふたたび折り重なった活性な状態で存在する。

ある種の状況においては、IL-1インヒビターは宿主

哺乳動物細胞から生産されたIL-11は、イオン交換クロマトグラフィーおよび実施例3記載のモノクローナル抗体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーを包含する方法により馴化培地から精製されよう。種々の改変および変更を本発明の方法および産物になしうることが当業者には明らかであろう。したがって本発明は、添付の請求の範囲およびそれらと同等のもの範囲内に入る限り本発明の改変および変更を包含することが意図される。

本発明の教示を詳細な問題または環境に適用することは、ここに含まれる教示にかんがみて当業者の能力の範囲内であろうことは理解されるべきである。本発明の産物の例およびそれらの単離および製造についての代表的な方法を下記に示す。

下記の実施例により本発明の種々の現在好ましい実施態様を示す。この実施例中において提供される刊行物は参考として導入される。

実施例

実施例1 タンパク質調製

A. 材料

ハンス平衡塩類溶液(HBSS)およびRPMIはMediatech, Washington, D.C.より購入した。LymphoprepはAccurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, N.Y. から得た。ヒトIgG, MTT, ウサギ抗プロスタグランジン

E. 抗血清、重炭酸アンモニウム、ジチオトレイトール、完全および不完全フロインドアジュバント、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンは Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri から購入した。C3H/HeJ マウスは Jackson Labs. Bar Harbor, Maine から購入した。BALB/c マウスおよび P3 ミエローマ細胞は National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine (NJC/IRM), Denver, Colorado の Drs. John Kappler および Philippa Marrack から得た。組換えヒト IL-1 は Cistron Biotechnology, Pine Brook, N.J. から得た。精製されたフィトヘマグルチニンは Wellcome Diagnostics, Research Triangle Park, N.C. から購入した。初代培養のヒト包皮線維芽細胞は NJC/IRM, Denver, Colorado の Dr. Richard Clark から得た。モノクローナルマウス抗-ウサギ IgG 抗体は AIA reagents, Aurora, Colorado から購入した。低濃度メチオニン RPMI は GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y. の Select-Amine キットを使用してつくった。³⁵S-メチオニン、ジフェニルオキサゾールおよび [¹⁴C]-ヨード酢酸は DuPont-NEN, Chicago, Illinois から得た。ウシ胎児血清は HyClone Laboratories, Logan, Utah から購入した。Mono Q および Superose 12 カラムは Pharmacia Inc., Piscataway, N.J. から購入した。C4 逆相カラムは Synchrom, Inc., Lafayette,

Indiana から得た。C8 逆相カラムは Applied Biosystems, Inc., Foster City, California から得た。アセトニトリルおよびポリエチレングリコール 8000 は J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J. から購入した。トリフルオロ酢酸およびグアニジン塩酸塩は Pierce Chemicals, Rockford, Illinois から得た。エンドブコティナーゼ LysC は Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana から得た。PGE₂ ELISA に使用したマイクロタイタープレートは Intermountain Scientific Corporation, Bountiful, Utah から得た。Nunc-Immuno Plate I であった。ハイブリドーマ産生に使用したプレートは Costar, Cambridge, Massachusetts から得た。

B. 単球 IL-1 ヒンビターの生成

ヒト白血球は正常献血者のものを白血球移動により得て、ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) 中に詰まった細胞 1 部に対し HBSS 1 部の割合で懸濁し、Lymphoprep を下に入れて、室温で 400×g にて 30 分間遠心した。単核細胞フラクションを取り出し (代表的には 4-5×10⁶ 細胞が 1 人の献血者当り得られる)、Ca⁺⁺ も Mg⁺⁺ も入っていない HBSS 中で洗浄し、無血清 RPMI 中に懸濁しそして Sephadex G200 でのクロマトグラフィーにより LPS を取り除いた正常ヒト IgG を被覆してあるペトリ皿に塗布した (100mm 皿当り 10ml 中に 6×10⁶ 細胞)。すべて

の試薬は LPS を 10pg/ml 以下しか含有しなかった。細胞を 24-48 時間培養し、生じた馴化培養地は粗製 IL-1 ヒンビター (IL-1i) 上清を構成した。代表的には、1 人の献血者からの細胞は 700-800ml の粗製 IL-1i 上清を生じた。

C. IL-1 ヒンビターのアッセイ

2 種の IL-1 アッセイが IL-1i の検出にルーチンに使用されている。3 日間の刺激の後、³H-チミジンとり込みまたはテトラゾリウム塩 MTT の取り込みにより測定して (Mosmann, T., J. Immunol. Method, 65:55-61 (1983)) 胸腺細胞 (4-6 週令の C3H/HeJ マウスからの 1×10⁶ 細胞) は、組換えヒト IL-1 の 1.0 ユニット/ml + 1 μg/ml のフィトヘマグルチニンに半最大増殖により応答する。粗製 IL-1i 上清は 1/10 希釈でこの増殖性応答を完全に阻害する。ヒト皮膚線維芽細胞 (96 ウェルプレートで 1 ウェル当り 1×10⁵ 細胞) は代表的には 0.5 ユニット/ml の組換えヒト IL-1 の 6 時間の刺激に対して、ELISA により測定できる約 50,000pg/ml の PGE₂ を分泌して応答する。このアッセイは胸腺細胞アッセイと同じ位に IL-1i に対して感度がよい。

D. IL-1 ヒンビターの代謝的標識

IL-1i を、IgG で被覆したプレート (B に記載) 上 0.75 μg/ml の冷たいメチオニン (通常 15 μg/ml) だけを含有し 10⁶ 細胞当り 0.5mCi ³⁵S-メチオニン (1151 Ci

/mmol) を加えた無血清 RPMI 中で単核白血球を 48 時間培養することにより代謝標識した。プレートが IgG でなくウシ胎児血清で被覆されていることを除いては同一に对照標識化を行った。細胞をウシ胎児血清で被覆したプレートで培養した場合、かかる对照上清に関するアッセイでは、ほとんど IL-1i を分泌しないことが示された。

(本頁以下余白)

E. IL-1インヒビタータンパク質の精製

粗製IL-1i上清を塩化ナトリウム中で1.0Mにし、1時間氷上でインキュベートし、10,000rpmで15分間遠心した。次に全てのインヒビター活性を含有するが最初のタンパク質の20%だけである上清を、Mono Q陰イオン交換カラムでタンパク質のグラジェント分離を行うために0.1%スクロースを含有する0.025Mトリス、pH7.6(A緩衝液)で4℃にて長く透析した。透析に続いてインヒビターを含有する溶液を10,000rpmで15分間再度遠心し、次に0.22μmのナイロンフィルターに通した。上清は代謝標識したものを同様に調製した上清10mlと通常いっしょにしてベッド容量1.0mlまたは8.0mlであるMono Q-Superose(Pharmacia PPLC)カラムに負荷し、流出物のOD₂₈₀が基準値にもどるまでA緩衝液で洗浄しそして緩衝液A中の直線状塩化ナトリウムグラジェント(0.025-0.10M)を使用して注意深くクロマトグラフィーした。カラムフラクションを収集し、放射能および生物活性について分析した。また各フラクションの試料は還元型12.5% SDS-PAGEで操作し、銀染色し、ジフェニルオキシゾールを浸透させ、乾燥しそしてフィルムの上に置いてオートラジオグラムデータを得た。第1a図は代謝標識したIL-1i上清各3mlと混合した40mlの粗製IL-1i上清のMono Qクロマト

グラフィーのタンパク質プロフィールを示す。重ね合わせたものは各フラクション50μl中に見られる放射能の最ならびにPGE₂産生アッセイで測定されたIL-1iの生物活性である。生物活性の3つのピークと完全に相関関係があるふたつの大きなおよびひとつの小さな放射能種が示される。第1b図は1μgでなくウシ胎児血清(FCS)を被覆したプレートで代謝標識した単球の上清3mlと混合した粗製IL-1i 15mlの同様のクロマトグラフィーを示す。上記した3種の放射性レベルは著しく減少している。第2a図は第1aおよび1b図中で示したクロマトグラフィー中の関心のある領域からのフラクションに対して行った銀染色ゲルを示す。第1a図(フラクション52および58)中のピーク放射能および生物活性フラクションは両方ともSDS-PAGEで22Kdで大きなバンド(矢印で示す)を示すことに注目すべきである。第3の種(第1a図中のフラクション48)はSDS-PAGEで20Kdで1本のバンドを示す。粗製IL-1iのゲル濾過実験は、活性分子が18-25Kdの分子量を有することを示している。第2b図は第2a図中に示したゲルのオートラジオグラムである。20および22Kdでのタンパク質バンドがこれらのフラクションにおける主要な放射性種であることが容易にわかる。

これらの結果を要約すると、1μgを被覆したベトリ皿に塗布した単球の代謝標識により放射能種を生じ、

これはもしその細胞をFCS被覆ベトリ皿に塗布した場合にはわずかにしか生じないものであることを我々は示した。これらの誘導された放射能種はIL-1i生物活性のいくつかの種とともにMono Qで完全に同時にクロマトグラフィー移動し、そしてゲルおよび生じたオートラジオグラムは3種の主要な分子がIL-1iの予測される分子量を有するタンパク質であることを示している。

IL-1i分子を配列決定するために2つの方法でさらに精製した。第一にピーク生物活性および放射能を有するMono QフラクションをC4逆相カラムに負荷し、H₂O/0.1% TFA:アセトニトリル/0.1% TPAグラジェントで溶出した。IL-1i分子はトレース標識しただけなので、各フラクションからの試料は放射能を直接計数し、またSDS-PAGEで分析した後オートラジオグラフィーした。第3a図は放射能パターンを重ね合わせたかかろクロマトグラフィーを示す。各フラクションからの試料に対して行った銀染色ゲル(第3b図)およびそれに続くゲルのオートラジオグラム(第3c図)は、IL-1i分子がフラクション32-36に見出されることを示している。これらのフラクションを乾燥しそして配列決定した。別法として、ピークMono Qフラクションをスピードバック(Speed Vac)で乾燥し0.4mlの0.05M NH₄HCO₃中に再懸濁しそして第4aおよび

4b図に示されるように同じ緩衝液で平衡化した10×300mm Superose 12ゲル濾過カラム(Pharmacia PPLC)で2回直接クロマトグラフィーした。フラクションを収集し各試料の放射能および生物活性を検査し、銀染色により分析しそしてSDS-PAGEをオートラジオグラフィーした。次に適当なフラクションをスピードバックで乾燥して配列決定した。

実施例2

IL-1インヒビターの提案された配列決定法

配列決定に先立ち試料を6M Guanidinium-HCl, pH8.6中に溶解し、N₂の下でタンパク質に対して100倍モル過剰のジチオトレイトールで37℃にて4時間還元し、400倍過剰の¹⁴Cヨード酢酸で1時間アルキル化した。その場合、反応物はC8逆相カラムで脱塩し、溶出しそして部分的に乾燥されよう。N末端配列はApplied Biosystems Protein Sequencerを用いて決定されよう。内部配列を得るためには、還元されアルキル化された試料は当業上知られた方法を用いて異化シアンまたはタンパク分解酵素で消化されよう。反応物は乾燥し、0.1% TPA/H₂Oに溶解し、そしてペプチドはC8逆相カラムを用いて分離されよう。

実施例3

IL-1インヒビター種の精製および配列決定

A. IL-1i-X, IL-1i-aおよびIL-1i-b種

IL-11 の Mono Q 精製により第 1 a 図に示され、実施例 1 (その活性ピークフラクションは 48, 52 および 59 である) に記載されているように生物学的活性が 3 つの主要な種に分解される。第 2 a 図に示されるように、これらのフラクションの試料に対する SDS-PAGE によりそれぞれ 20KD、22KD、および 22KD において関連する種が示される。下記実施例 4 に記載されるマウス抗血清を用いるかかるゲルのウェスタン分析ではこれら 3 種全てが染色される。IgG を被覆したプレートで増殖している間に 35 S-メチオニンで代謝標識された細胞から IL-11 が調製された場合、各これらのバンドは放射性がある (上記ゲルのオートラジオグラムで第 2 b 図に示される)。実施例 1 で論じた論理にもとづいて、すなわち非誘導条件下でインキュベートした平行細胞は IL-11 生物活性を産生せずまたこれらの放射性バンドも産生しないので、我々はこれら 3 種が生物活性の原因となるものであると結論することができる。我々はこれらの種をそれぞれ IL-11-X、IL-11-a、および IL-11-b と仮りに名づける。

B. IL-11-X の精製および配列決定

IL-11-X および/または IL-11-a を含有する Mono Q フラクションを Synchropak RP-4 (C4) カラムでの逆相 HPLC クロマトグラフィーによりさらに精製し、そして放射性種を配列分析に用いた。RP-HPLC 精製 IL-11-a お

よび IL-11-b を直接配列決定しようとする数々の試みは失敗しており、このことはそれらの N 末端が化学的に遮断されていることを示す。しかしながら、IL-11-a (IL-11-a B2p42) のひとつの調製物から下記の配列:

$\text{P S G R K S S K M}^{\circ} \text{Q A F} - \text{I}^{\circ} \text{S D V N Q}^{\circ}$

が得られ、そして次に C4 RP-HPLC により同様に精製された IL-11-X の調製物も同じ配列を生じた。

PrepKxP24 $\text{I}^{\circ} - - - - - \text{M}^{\circ} \text{Q A F} - \text{I}^{\circ} \text{D} - \text{V N}^{\circ} \text{K} - \text{F}$
および

PrepKxP23 $\text{R P} - - \text{R K} - \text{L K M Q A F} - \text{I}$

これらは明らかに IL-11-a を配列決定する最初の試みにおいて見出された配列の一部である。示されている配列データは IL-11-X と呼ぶ 20KD 種の N 末端であるというのが発明者らの結論である。

これらおよびそれに続く全ての配列において、下線を付した位置は残基を同定できないかまたは同定される基についてあいまいな点が存在することを示す。2 つまたはそれ以上の残基がひとつの位置に置かれている場合、このことは 1 個以上のアミノ酸が、その配列決定段階で検出されたことを示し、そしてより正しそうに思われる残基が上段にある。

C. IL-11-a および IL-11-b のペプチドの生成、精製、

および配列決定

IL-11-a および IL-11-b はその N 末端が明らかに化学的に遮断されているので、各ペプチドはエンドプロテイナーゼ消化により生成させた。詳細には、IL-11-a または IL-11-b を含有する Mono Q フラクションを前実施例全てにおいて使用された C4 カラムと許容できる代替物である 4.6×250mm C8-RP HPLC カラム (Zorbax Protein Plus) に通した。非常にゆるやかなグラジエント (0.5 ml/分 で 1 分当り 0.2% アセトニトリル) により主要な検出放射性種である ヒトリゾチーム から IL-11-a (第 8 a, b 図) または IL-11-b (第 9 a 図) を分離した。精製した種の同一性は SDS-PAGE およびそれに続くオートラジオグラム (第 8 c, d および 9 b 図) で単一の、放射性的、22KD タンパク質の存在により確認された。タンパク質をシリコーン処理したグラスチューブに手で収集しそしてそれぞれに 0.2% ツイーン-20 溶液 25ml を加えた。次に IL-11 含有フラクションをスピードバックで 50ml となるまで容量低下させ、1% NH_4HCO_3 の添加により 300ml となし、次に 1 ml のエンドプロテイナーゼを添加した。IL-11-a の場合、使用した酵素は Endoproteinase LysC (Boehringer-Mannheim) であり、一方 IL-11-b は Endoproteinase AspN (Boehringer-Mannheim) により切断した。切断は 37°C で 16 時間行い、次に反応混合物の容量をスピードバックにより 50ml に

減少させた。

IL-11-a の場合、試料を直接クロマトグラフィーにかけたが、IL-11-b 試料は初め 2M トリス、pH 8.0 中の 50mM ジチオトレイトール 5 ml の添加により還元し、37°C で 30 分反応させ、次に 10ml エタノール中の 1.1 μmol ^3H -ヨード酢酸の添加によりカルボキシメチル化した (暗室にて 37°C で 30 分間反応)。ペプチドの分離はマイクロブアー設備およびマイクロブアーコンパチブルポンプを備えた Beckman HPLC を用い 100ml/分の流速で 2.1×250mm Brownlee Aquapore RP-300 (C8) ナローブアーカラムで行った。200 分の 0-100% 直線状グラジエントを用いた ($\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TPA から アセトニトリル/0.1% TPA まで)。ペプチドの分離を第 10 および 11 図に示す。得られた配列情報は次のとおりである。

(本頁以下余白)

特表平3-505279 (17)

```

1       5       10
RaLysC-41  H Q A F _ I _ D V N Q K

1       5       10       15       20       25       30
RaLysC-53  _ F Y L _ N H Q L V A _ Y L Q C P N V N L R E Q I D N _ S

1       5       10       15       20       25       30
RaLysC-61  _ F A T I R E Y H

1       5       10       15       20       25       30
RaLysC-11  F Y F Q E D

1       5       10       15       20       25       30
RaLysC-17  _ Q D I T _ L Q L E A N R Q I Q L G E K

1       5       10       15       20       25       30
RaLysC-33  _ _ E T E L Q L E A V _ I T D L L E H

1       5       10       15       20       25       30
RaAspN-51  D V N I I I Y A E H N Q L V A C Y L Q C P N V N L

1       5       10       15       20       25       30
RaAspN-43  D E G V N V T K F Y F Q

1       5       10       15       20       25       30
RaAspN-39  _ F I G R E K S I I H Q A F R I Q

1       5       10       15       20       25       30
RaAspN-23  D K R F A F I R

1       5       10       15       20       25       30
RaAspN-20  D _ I V H N L K K I I

```

(本頁以下余白)

ペプチド配列の2種は先にIL-1i-Xから得られたものと明らかに関連している。これらの一方であるRaLysC-41はIL-1i-a配列でありそしてもう一方であるRaAspN-51はIL-1i-b配列であり、このことは3種のIL-1iがもし単一のものIL-1i分子の化学的および/または物理的改変形態でないならば、少なくとも密接に関連したタンパク質であることを示している。列挙した配列を合一すると、以下の複合配列が生ずる:

```

.....RaLysC-41.....RaLysC-11.....RaLysC-33.....
.....RaAspN-51.....RaAspN-43.....RaAspN-39.....
.....RaAspN-23.....RaAspN-20.....
E P S G L E E S H Q A F A I S D V N Q K T F Y L R E Q L V A C Y L Q C P N V N L E E I D _ I

.....RaLysC-11.....
.....RaAspN-43.....
D E G V N V T K F Y F Q E D

.....RaLysC-33,39.....
.....RaAspN-23.....
E G D I T E L Q L E A V I T D L L E H

.....RaLysC-41.....
.....RaAspN-20.....
D K R F A F I R I I

```

(本頁以下余白)

これら複合配列は最も最近更新されたタンパク質同定リソースデータベース (Protein Identification Resource Database) (PIR 16.0) にリストされている他の既知ポリペプチドには何ら存在しないと思われる。本発明者らは、これら配列またはそのマイナーな変種はIL-1インヒビターとして作用しうる種類の分子であると考える。

実施例 4

IL-1インヒビター特異的抗体の調製

10週令BALB/cマウスに、粗製上清から Mono Q-クロマトグラフィーにより部分精製 (400倍) し、PBSで透析しそして完全フロイドアジュバントで乳化したIL-1iを皮下注射した。各マウスは粗製上清5mlから精製されたIL-1iを与えられた。これらマウスには不完全フロイドアジュバントで乳化した同量のIL-1iを2週間毎に追加免疫し、そして各追加免疫の7日後に尻尾から血清試料を採った。抗血清を第5a図に示されるように、SDS-PAGEによるイムノゲンのウェスタンブロット分析により抗-IL-1i活性について検査した。第5b図は、すべてのマウスがIL-1iの3回注射後に抗-IL-1i抗体を生成したことを示している。

モノクローナル抗体は発現ライブラリーからのIL-1i遺伝子のクローニング、組み換えIL-1iタンパクの精製、およびその分子の生物学の研究に非常に価値があ

ろうから、我々はIL-1i 特異的な一群のモノクローナル抗体の製造を開始した。B細胞ハイブリドーマを生成させるには、前記マウスに食塩水中の同量のIL-1iを静脈注射しそして24時間後に脾臓を摘出した。脾臓細胞を脾臓から冷平衡塩類溶液(BSS)中にほぐして入れ、BSSで2回洗浄し、脾臓B細胞 10^6 個当りP3ミエローマ細胞 2×10^6 個の割合でP3ミエローマ細胞と混ぜ合わせそして遠心分離した。乾燥ペレットに温かい、ガス添加 (5% CO_2) PEG 8000 (40%ポリエチレングリコール6000:60%最少必須培地) 1mlを滴下することにより、細胞を融合させた。融合した細胞をBSSで洗い、腹腔細胞 2×10^6 /mlを含有する富培地 (10% FBS) 10ml中に再懸濁させそして10mlピペットを用いてペレットを緩やかにくずした。容量を培地中の腹腔細胞をさらに加えることにより20mlに調整し、そして細胞を96ウェルプレートに0.1ml/ウェルで塗布した。プレートをガスインキュベーター中に入れ、そして次に下記様式で処理した。

第1日目-富培地中の3×HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を最終濃度×1となるまで添加、

第5日目-富培地中の1×HAT 200μlと置換することにより培地交換、

第10日目-ハイブリッド増殖についての検査開始。腹

腔細胞 $1.5 \times 10^4/\text{ml}$ を含有する富培地中の $1 \times \text{HAT } 200 \mu\text{M}$ で置き代えることにより培地交換。

ハイブリッド細胞がウェル中でほとんど集密になったところで上清を検査のために移し、そして細胞をピペットの先端で穏やかにかきとって富培地中の $1 \times \text{HAT}$ プラス腔細胞 $3 \times 10^4/\text{ml}$ を含有する 1 ml の培養ウェルに移した。

高密度ウェルからの上清は、部分精製 IL-1i (マウスに注射されたと同一の、Mono Q-精製物質) をマイクロタイターウェルに結合させた ELISA を用いて抗-IL-1i 活性について検査する。正常マウス血清および高度免疫抗血清をそれぞれ陰性および陽性対照として用いる。陽性上清は均質に精製された IL-1i を被覆したプレートでの ELISA および精製され代謝的に標識された IL-1i の免疫沈降により再検査されよう。次に陽性細胞を限界希釈法によりクローン化しそしてプリスタン処置マウスに注射して腹水を生成させる。組織培養または大量生成およびマウスの腹水液の収集により大量の IL-1i 特異的抗体を生産できる。これら抗体の精製およびそれらを不溶性ビーズに付着させると、組み換え IL-1i タンパク質精製のためのアフィニティ吸着剤が生成されよう。

162:156-159(1987) 記載の AGPC 法により、この溶解物から単離した。

ポリ A⁺ RNA を Aviv, H. および Leder, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69:1408-1412 の方法によりオリゴdT セルロースクロマトグラフィーにより単離し、エタノール沈降させそして $0.36 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に溶解させた。Gubler, U. および Hoffman, B. J. (1983) Gene 25:263-269 記載の方法に従いポリ A⁺ RNA に対して 1 マイクログラムを用いて cDNA を調製した。

この cDNA を Boehringer Mannheim カタログ No. 988448 または New England Bio Lab No. 1070 からの EcoRI リンカーを用いそして製造者の説明書に従い、ラムダgt11 発現ライブラリー中に組み込んだ。

10^4 個の独立したクローンを含有する生成するライブラリーを、R. A. Young および R. W. Davis [(1983) PNAS 80:1194-1198] により記載されるスクリーニング条件を用いて、先に記載の IL-1i に対する適当なポリクローナル抗体を用いて E. coli Y1090 rk⁻ (Promega Biotec) で選抜した。陽性シグナルは Bayer, E. A. および Wilchek, M. (1979) により Methods in Biochemical Analysis に、および Guesdon, J. L. Ternynck, T. および Avrameas, S. (1979) により J. Histochem. Cytochem. 27:1131-1138 に記載されるようにして、および製造者の説明書に従い、ビオチニル化第 2 抗体 (例えばヤギ

実施例 5

IL-1i cDNA のクローニング

IgG 被覆ベトリ皿に塗布しそして [³⁵S]-メチオニンの存在下に 24 時間培養した単球は Mono Q でのクロマトグラフィーにより同定できる [³⁵S]-IL-1i を生成することが示された。

いつ (24 時間の期間中) IL-1i が最大割合で生成されるか判定するために、塗布された単球を [³⁵S]-メチオニン (パルス) に短い、2 時間の間曝露させたところで大過剰の未標識メチオニンを加えてさらに 2 時間インキュベートした。次に培地を収集して放射性標識された IL-1i について分析した。この操作を IgG 被覆プレートへの塗布後種々の時点で単球に適用しそして、塗布 15 時間後に単球を [³⁵S]-メチオニンに曝露させると最大量の [³⁵S]-IL-1i を生成することが判明し、このことは単球中の IL-1i mRNA が IgG への塗布 15 時間後でその最大レベルにあることを示している。

次に新鮮な単球を実施例 1 B におけるようにして得られた LPS 不含 IgG に塗布した。RPMI 培地中 37°C で 15 時間インキュベート後、細胞を細胞緩衝食塩水で洗い、次に 4 M グアニジニウムチオシアネート: 25 mM クエン酸ナトリウム pH 7, 0.5 % サルコシル, 0.1 M 2-メルカプトエタノールで溶解させた。次に全 RNA を P. Chomczynski および N. Sacchi の Analytical Biochemistry,

抗-マウス IgG, Bethesda Research Labs) に続いてストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ複合体 (Bethesda Research Labs) を用いて検出されよう。

実施例 6

IL-1i をコードする遺伝子の調製および配列決定

実施例 5 記載のようにして調製された cDNA をクローニングベクターラムダ GT10 に組み込んだ。この cDNA を、基質として S-アデノシル-メチオニンをを用い、EcoRI メチラーゼで初めにメチル化し、EcoRI リンカーを連結反応で結合させ、そして過剰のリンカーは EcoRI エンドヌクレアーゼでの消化および CL6B スピンカラムでのクロマトグラフィーにより除去した。リンカー結合され、分子量で選択された cDNA $0.124 \mu\text{g}$ および EcoRI 切断されホスファターゼ処理されたラムダ GT10 $1 \mu\text{g}$ を含有する反応物で連結反応を行い、そしてこの連結反応の生成物を GIGAPACK GOLD パッケージング抽出物 (Stratagene) を用いてパッケージした。それにより 1×10^7 メンバーのライブラリーが得られた。

この GT10 ライブラリーを選抜するために、実施例 3 に提示されるタンパク質およびペプチド配列に基づきオリゴヌクレオチド (アンチセンス) プローブを合成した。プローブの配列およびそれらの相当するペプチド配列は次のとおりである。

Probe #IL111-3 T T T A C G T C G N A A 5'
Lys Met Gln Ala Phe

Probe #IL111-4 T T A A A T A A A G T C T C T 5'
Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp

Probe #IL111-5 T A C C A N T G N T T A A A T A A A 5'
Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe

Probe #IL111-6 C T C C A N T T A G T T T T G 5'
Asp Val Asn Gln Lys Thr

Probe #IL111-7 T T G T T T T G N A A A T 5'
Asn Gln Lys Thr Phe Tyr

Note: N = A, C, G, and T

プローブ#IL111-3はその5'末端で³²P-ホスホリル化されそしてライブラリーの8×10⁴ブラークを選抜するのに用いられた。このプローブは3個のブラークに複製可能にハイブリダイズし、そしてそれらのうち1種のブラークがプローブ#IL111-4にもハイブリダイズす

クレオチドプローブ（前出）のそれぞれにハイブリダイズさせた。オリゴヌクレオチド濃度は1 pモル/mlでありそしてハイブリダイゼーション温度は以下のとおりであった。

レーン	プローブ	温度
6	#IL111-3	35°C
8	#IL111-4	42°C
10	#IL111-5	42°C
12	#IL111-6	40°C
14	#IL111-7	35°C

洗浄後、ストリップを並べ、テープでくっつけてもとのニトロセルロースシートを再生した。これを増感スクリーンの存在下に -70°Cで24時間オートラジオグラフィした。第12b図はこのオートグラフの写真である。これにより、全てのプローブが1850bpフラグメントに特異的にハイブリダイズする証拠が提供され、このことはこのフラグメントがIL1 インヒビターの実質的なコード配列を担持することを証明している。

そのDNA配列を決定するために、GT10-IL11-2A DNAをEcoRIで消化し、1%アガロースゲルで電気泳動しそして1850bpフラグメントを単離した。このフラグメントをEcoRI消化M13 mp19と連結し、そしてE.coli株JM 108中に形質転換した。形質転換体をβ-ガラクトシダーゼ活性を欠くものについて探索することにより

特表平3-505279 (19)

ることが示された。このブラークGT10-IL11-2Aを培養しそして製造者の説明書に従いLambdasorb(Promega)を用いてDNAを単離した。GT10-IL11-2Aは American Type Culture Collection(ATCC)、Rockville, Marylandに受託番号40488の下に寄託されている。このDNAをEcoRIで消化し、5等分し、そして1%アガロースゲルで電気泳動した。

電気泳動後、このゲルをエチジウムブロマイドで染色した。このゲルの写真を第12a図に示す。レーン6, 8, 10, 12および14はEcoRI消化からの5等分物を含有する。レーン5は分子量マーカーとして有用なHindIII切断野生型ラムダDNAとHaeIII切断φ×174 RF DNA (New England Biolabs)の混合物を含有する。第12a図は、GT10-IL11-2Aが長さ1850塩基対のEcoRIフラグメントを含有することを示している。

この1850bpフラグメントがIL1 インヒビターのコード配列を担持することをもっと結論的に示すために、サザンブロットを以下のようにして実施した。第12a図に示されるゲル中のDNAフラグメントを標準的方法を用いてニトロセルロース上にブロットした。次にこのニトロセルロースを各ストリップがレーン6, 8, 10, 12および14からのDNAを含有するように5個のストリップに縦に切断した。次にこれらストリップを、5'末端で³²P-ホスホートで標識した5個のオリゴヌ

選抜した。5種のかかる形質転換体を単離し、一本鎖DNAを調製し、そしてSangerらの方法に従い配列決定した。3種の形質転換体のDNA配列はmRNAの5'末端に相当するが、2種の形質転換体はタンパク質コード配列を提供した。第13図は、cDNAのタンパク質コード領域に関して得られたDNA配列を示す。

第13図はまた予想アミノ酸配列をも示す。第1番目のアミノ酸アラニンから第29番目のアミノ酸プロリンまでおよび第79番目のアミノ酸イソロイシンから末端までのアミノ酸配列が仮説アミノ酸配列である。第30番目のアミノ酸プロリンから78番目のアミノ酸プロリンまでの予想アミノ酸配列は実施例3記載のペプチド配列と一致する。

実施例7

GT10-IL-11-2AおよびIL-11の配列決定

GT10-IL11-2Aの部分を配列決定しそして第14図に示す。このDNAはIL-11に特徴的なアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする（ヌクレオチド99-557）。しかしながら、このタンパク質が細胞外環境中に分泌される前にいくつかの修飾がなされうと考えられる。これらの修飾はそのタンパク質がIL-11としての活性を有するのに必須であるかも知れないしないかも知れない。

GT10-IL11-2AはXとして知られるIL-11の形態のア

ミノ末端に対してN末端である少くとも32個のアミノ酸(ヌクレオチド3-98)をコードする。これら32個のアミノ酸中には、ヌクレオチド24-28によりコードされるMで始まり、新生IL-11を細胞外環境方向へ指示しそして次にリーダーペプチダーゼおよび場合により他のペプチダーゼにより除去される分泌リーダー配列が含まれると考えられる。この配列がIL-11のアルファおよびベータ形態で除去される程度は現在知られていないが、これら形態のN-末端はX形態のそれに近接していると考えられる。分泌リーダー配列の除去は恐らくそのタンパク質が有効なIL-11活性を有するのに必要であろう。

GT10-IL11-2Aのヌクレオチド349-351はコンセンサスN-グリコシル化部位の一部分であるN-残基をコードする。それらがN-グリコナーゼで消化され易いことに基づき、IL-11のアルファおよびベータ形態がグリコシル化されると考えられる。X形はこの酵素での消化を受け易いとは考えられていないので、ここに提供される情報を用いてタンパク配列決定分野で通常の技術を有する者により容易に示されうる可能性は残りはするが、それはグリコシル化されないと考えられる。このN残基でのグリコシル化はそのタンパク質が有効なIL-11活性を示すのに必要ではないと考えられる。

できる。すべての場合においてプロモーターおよび他の遺伝子調節領域例えばエンハンサー(誘導可能またはそうではない)およびポリアデニル化シグナルはプラスミドベクター中のcDNA配列に関して適当な位置に置かれる。かかる作製物の2例は次のとおりである。(1)強力な構成性プロモーター領域を用いる作製物は、ここに参考文献としてとり込まれるGormanらのMol. Cell. Biol. 2:1044-1051, 1982に記載されるプラスミドpSV2 CAT中に見られるそのような配置におけるシミアンウイルス40(SV40)遺伝子調節シグナルを用いて作られなければならない。このプラスミドは第6図に示されるように標準的な分子生物学的技法(Mamiatzis, 前出)を用いてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)コード配列に代えてIL-11 cDNAが入るように操作されなければならない。(2)誘導可能な遺伝子作製物はマウスメタロチオネイン(MT-1)プロモーター領域(Brinsterら, Cell 27:228-231, 1981)を含むプラスミドpMKを用いて作られなければならない。このプラスミドは出発物質として使用できそしてメタルにより誘導可能な遺伝子作製物を生成させるために第7図に示されるようにして操作されなければならない。2. 活性タンパク質を生成させるためには、前記したベクターを用い多数の動物細胞系を使用してIL-11を発現させなければならない。外来遺伝子発現を促進させる

GT10-IL11-2Aのヌクレオチド99-101はP(第15図参照)をコードするが、IL-11のX形のこの位置(N-末端)ではPは検出されていない。この残基が成熟タンパク質では修飾されていることはありうる。この残基の修飾は有効なIL-11活性にとって必須要件ではないと考えられる。

アルファ形とベータ形の現在知られていないN-末端残基はエドマン分解によっては完全には検出できずそしてGT10-IL11-2Aによりコードされるタンパク質のN-末端残基の残りの除去に続いて修飾されているであろう。この修飾は有効なIL-11活性にとって必須要件ではないと考えられる。

実施例 8

IL-11をコードする遺伝子の動物細胞における発現

IL-11の動物細胞発現は下記工程を必要とする。

- 発現ベクターの作製;
 - 宿主細胞系の選択;
 - 宿主細胞への発現ベクターの導入;
 - IL-11の発現レベルを高めるために組み換え宿主細胞の操作。
- 動物細胞で使用するために設計されたIL-11発現ベクターは強力な構成性発現作製物、誘導可能な遺伝子作製物、ならびに特定の種類の細胞で発現させるために設計されたものを含む幾つかの種類であることが

それらの能力に関して十分に特性決定された2種の有効な細胞系は、IL-11の発現はこれら細胞系には限定されないが、マウスLtk⁺およびチャイニーズハムスター卵巣(CHO)dhfr⁻細胞である。

3. ベクターDNAは多数の遺伝子移入技術の任意のものを用いてこれら細胞系に導入されなければならない。ここで用いられる方法にはS.L. Graham & A.S. van der Eb (Virology 52:456-467, 1973)の燐酸カルシウムDNA沈澱法が含まれ、そこではIL-11の発現ベクターが選択可能なマーカーをコードする第2の発現ベクターと同時に沈澱される。Ltk⁺細胞トランスフェクションの場合、選択可能なマーカーはチミジンキナーゼ遺伝子でありそしてその選択はWigler, ら (Cell 16:777-785, 1978)により記載されており、CHO dhfr⁻細胞の場合には選択可能なマーカーはジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)でありその選択はRingold らによりJ. Mol. Appl. Genet. 1:165-175, 1981に記載されている。

4. IL-11遺伝子作製物を発現する細胞を次にIL-11生産レベルを高めるであろう条件下に増殖させなければならない。メタロチオネインプロモーター構築物を担持する細胞はここでMT-1プロモーター(Mayoら, Cell 29:99-108)の利用を5倍高めそれによりIL-11タンパク質レベルを同じく増大させるカドミウムのような重金

菌の存在下に増殖させることができる。DHFR発現ベクターと一緒にIL-1i 発現ベクター (SV40またはMT-1のいずれかに基づく) を含有する細胞はDHFRの競合的拮抗剤であるメトトレキサートをを用い、Ringoldら (J. Mol. Appl. Genet. 1:165-175, 1981)記載の遺伝子増殖プロトコルによって採取できる。これにより細胞中に存在するDHFR遺伝子のコピー数が増え、同時にIL-1i 遺伝子のコピーが増え、それによりより多くのIL-1i タンパク質が細胞により生産される。

実施例 9

組み換え動物からのIL-1iの精製

IL-1i は天然物質と同様に細胞から分泌されると予想されるので、天然のタンパク質の精製に関して前記した方法により組み換えタンパク質を同様な精製および特性決定ができることが予想される。

実施例 10

IL-1iの配列

IL-1i のアミノ末端残基は直接タンパク質配列決定により数回アルギニン(R)として同定されている。かかる配列決定の結果を実施例3に示す。これと反対に、cDNAの配列により予測されるIL-1i のアミノ末端残基はプロリン(P)である。このアミノ末端残基は第13図のヌクレオチド85-87に相当し、そして第14図および15図で○で囲んである。cDNA配列と直接タンパク質配

```

M E I X R G L R S H L I T L L L F L F H 10
S E T I X Z P S G R K S S K M Q A P R I 20
W D V N Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L 30
Q G P N V N L E E K I D V V P I E P H 40
L F L G I H G G K M X L S X V R S G D E 50
T R L Q L E A V N I T D L S E N R K Q D 60
K R F A F I R S D S G P T T S F E S A A 70
X P G W F L X T A M E A D Q P V S L T N 80
M P D E G V M V T K F Y F Q E D E 90

```

(式中Xはシステイン、セリンまたはアラニンであり
そしてZはアルギニンまたはプロリンである)。

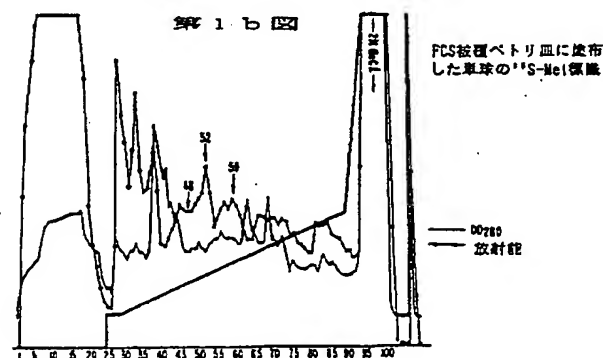
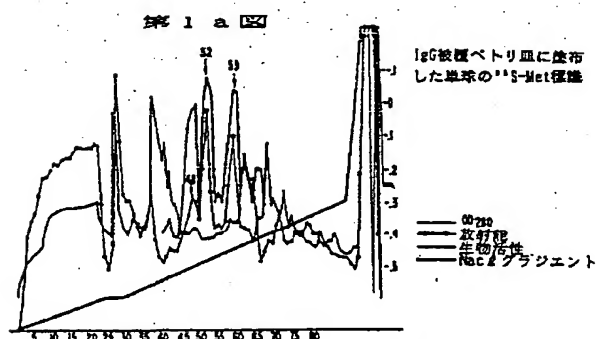
特表平3-505279 (21)

列の間のこの明らかな不一致は、cDNA配列における過誤がそのmRNAからの逆転写酵素により触媒された合成期間中にとり込まれたと想定することにより解決できる。すなわち、mRNA上に存在し、そこでそのアミノ末端残基をコードしようCGA(アルギニン) コドンは逆転写酵素反応中にcDNA中のCCA(プロリン) コドンに変化されることができたであろう。この種の逆転写酵素問題は以前に例えば、B.D. ClarkらのNucleic Acids Research 14:7897 (1986) により文献で報告されている。

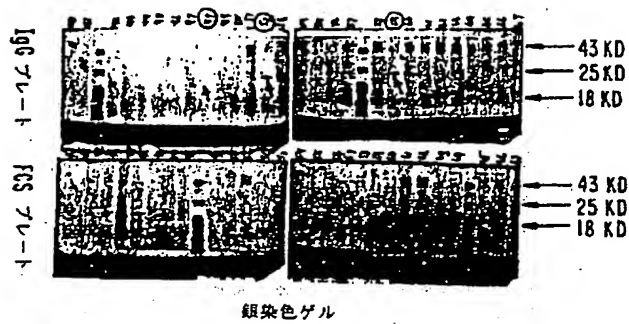
本発明者らは、アミノ末端アミノ酸が第13図に示されるプロリン残基の代りにアルギニンであることを除いてはこのタンパク質の正確なアミノ酸配列はcDNAにより予測されるとおりであると考えられる。本発明者らは、アミノ末端アルギニン配列が好ましいが、DNA配列およびそれらの相当するペプチド配列の両方が本発明の範囲に該当することを意図するものである。

実施例 11

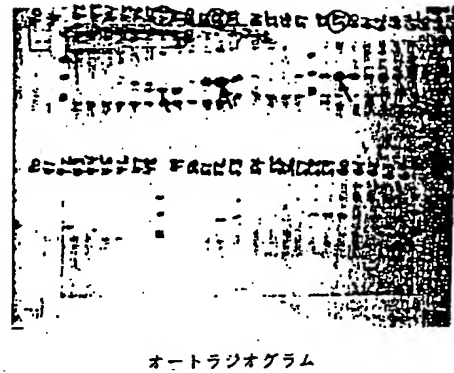
下配配列を有するタンパク質も本発明に包含される。
すなわち



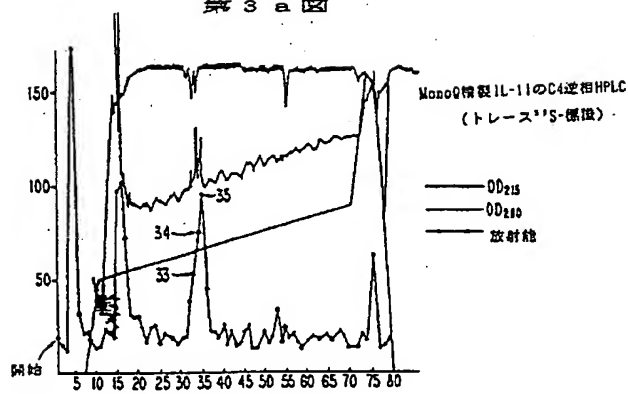
第2 a 図



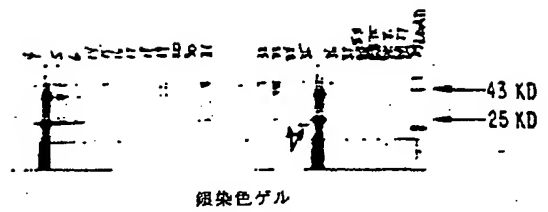
第2 b 図



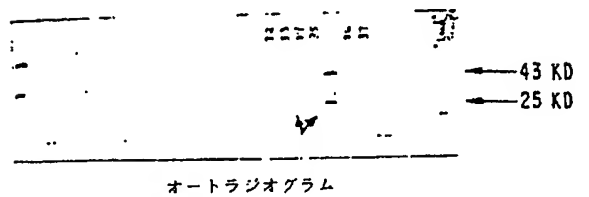
第3 a 図



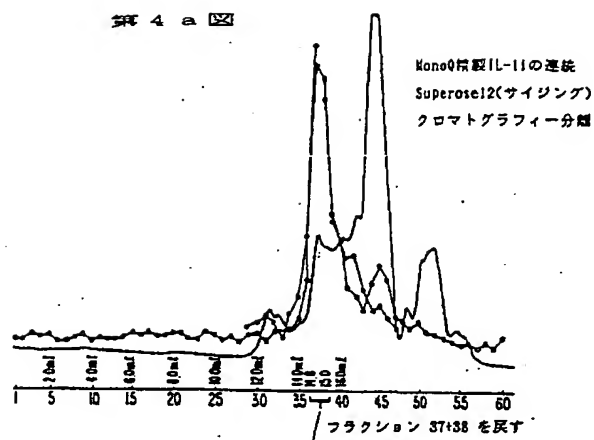
第3 b 図



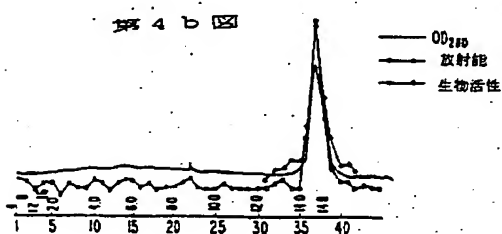
第3 c 図



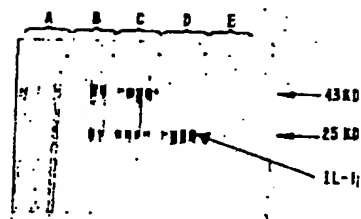
第 4 a 区



~~第~~ 4 b ☒

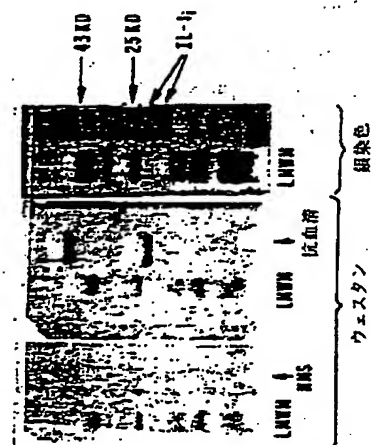
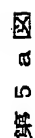


第 5 b 区

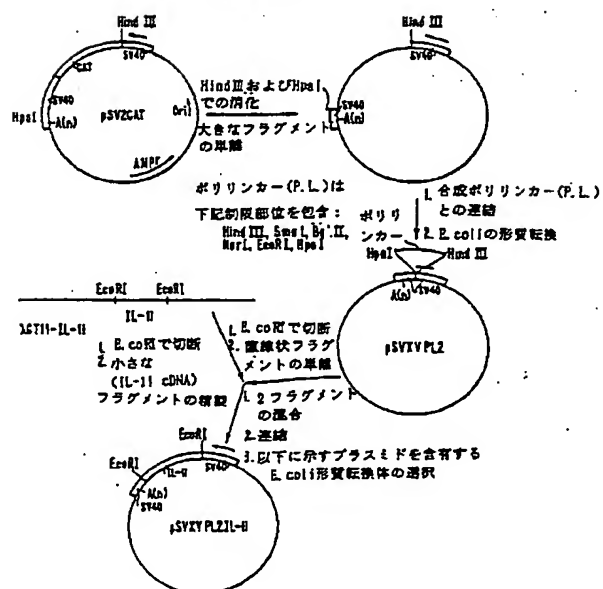


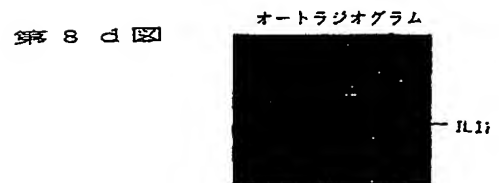
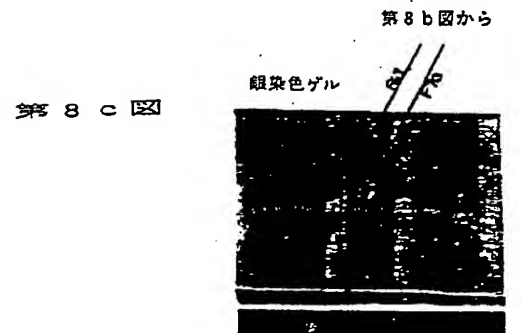
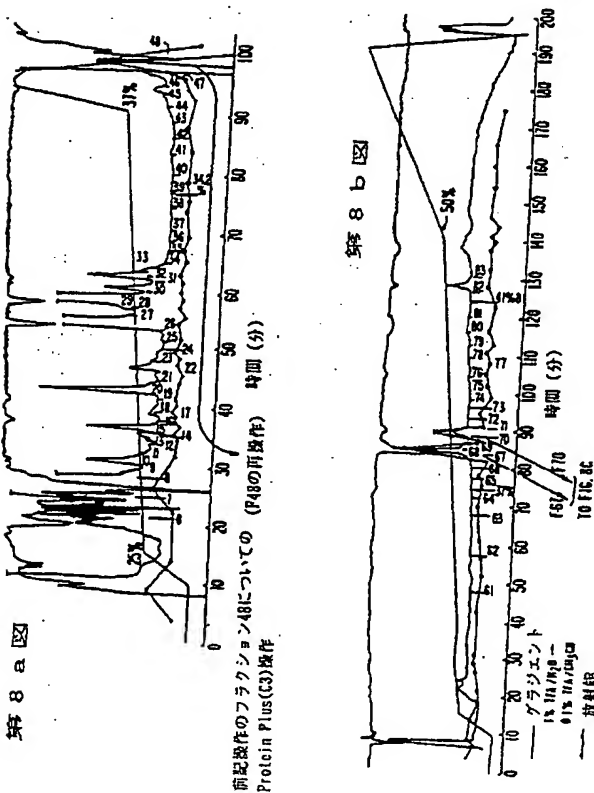
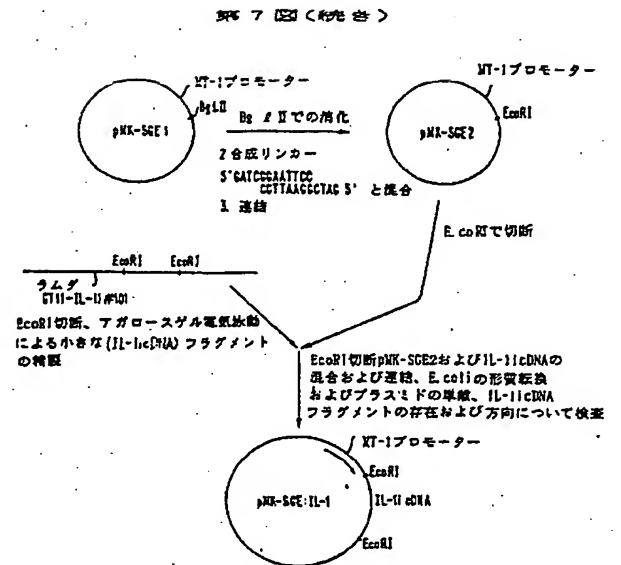
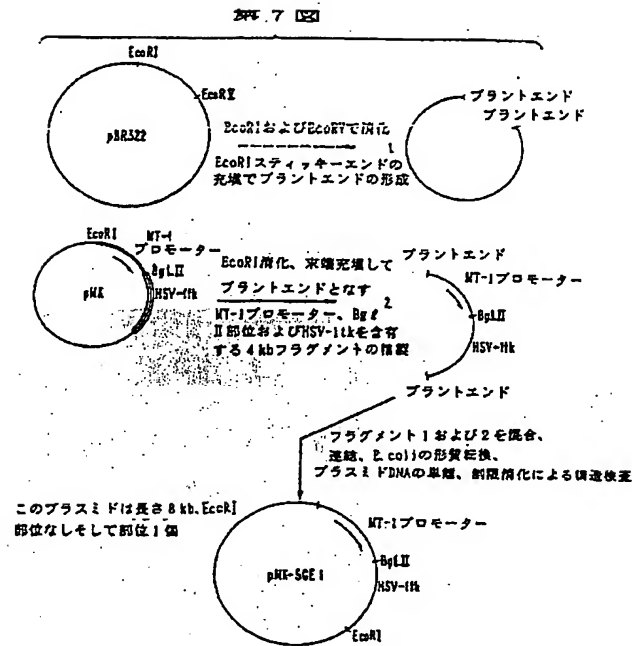
金5匹のマウス(A-E)の
別々に採血した血液
を用いるイムノゲンの
ウェスタン分析

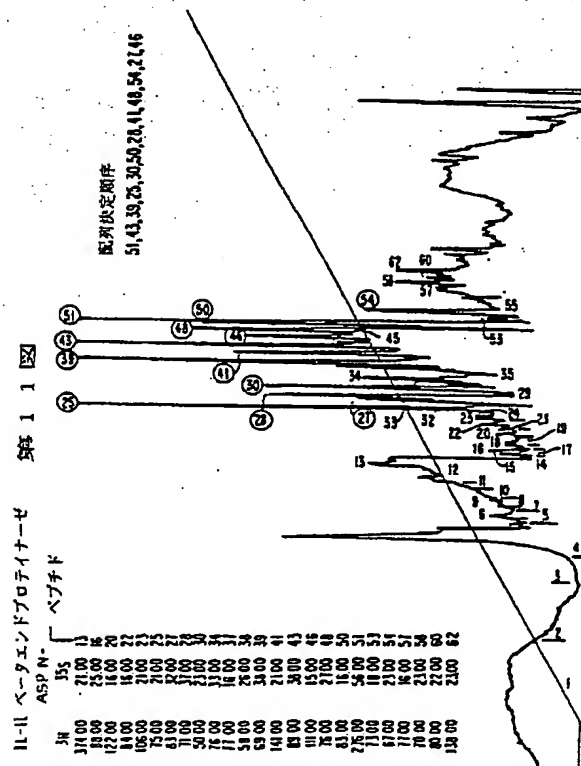
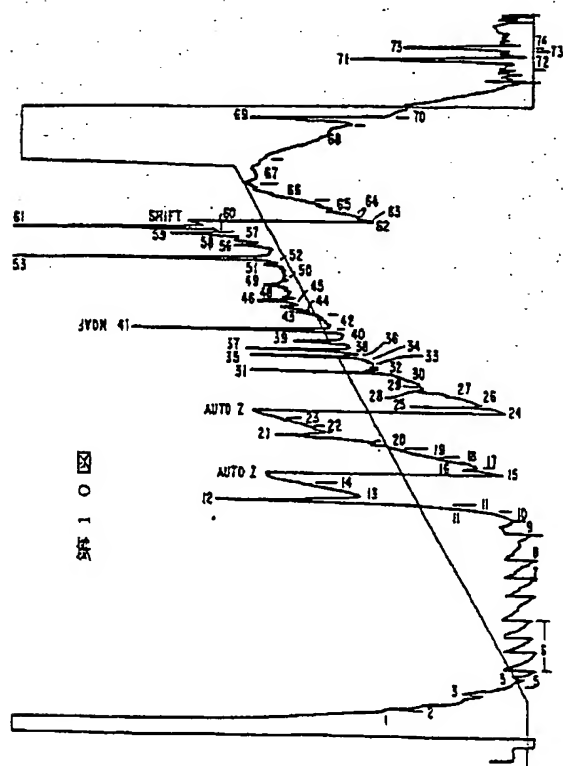
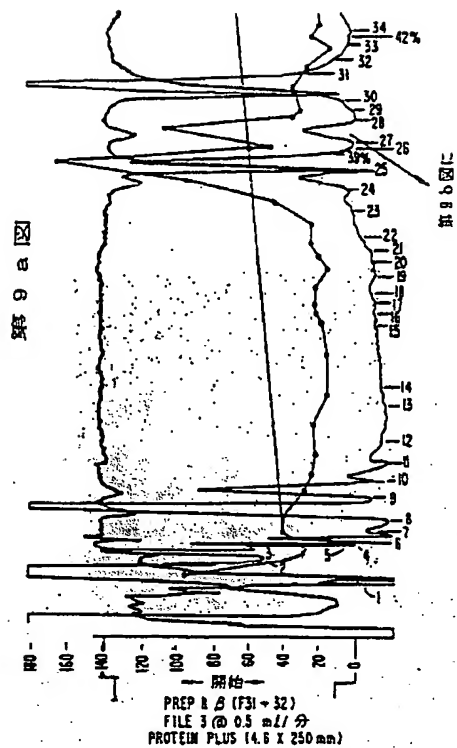
正常マウス血清(NES)および
全5匹のマウスからの
抗血清混合物を用いるイム
ノゼン(NanoQ精製IL-11)
のウェスタン分析



第 6 题







第 15 頁

M E I C R G L R S H L I T L L L F L F H
 S E T I C (P) S G R K S S K M Q A F R I
 W D V N Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L
 Q G P N V F L E Z K I D V V P I E P R A
 L F L G I E G G K M C L S C V K S G D E
 T R L Q L E A V N I T D L S E K R K Q D
 K R F A F I R S D S G P T T S F E E A A
 C P G W F L C T A M E A D Q P V S L T N
 H P D E G V M V T K F Y F Q Z D E

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 192(4) CIP 31700; COTR 13/00; COTR 13/13 U.S. CI. 435/68; 520/350; 536/27	
2. FIELD NUMBER U.S. 435/68, 70, 91, 172.1, 172.3, 252.33, 320 536/27 520/350 915/4, 10, 29, 32, 34, 38, 56, 57	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category: 1. Journal of Experimental Medicine, volume 163, issued March 1986, (ROBERTS et al) "Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or respiratory syncytial virus". See pages 511-519, see especially the abstract and figure 5. 1-4 5-25 2. Journal of Immunology, volume 134, issued June 1985, (LIAO et al) "Characterization of a human interleukin 1 inhibitor", see pages 3882-3886, see especially the abstract and figure 6. 1-4 5-25	
4. CERTIFICATION Date of the Actual Completion of the Investigation: 7 August 1989 Date of Review of the Investigation: 06 SEP 1989 Investigator: ISA/US Reviewer: J. E. L.	

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 192(4) CIP 31700; COTR 13/00; COTR 13/13 U.S. CI. 435/68; 520/350; 536/27	
2. FIELD NUMBER U.S. 435/68, 70, 91, 172.1, 172.3, 252.33, 320 536/27 520/350 915/4, 10, 29, 32, 34, 38, 56, 57	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category: 1. Journal of Immunology, volume 139, issued September 1987, (SECKINGER et al) "A urine inhibitor of interleukin 1 activity affects both interleukin 1 and interleukin 1 β but not tumor necrosis factor α ". See pages 1541-1545, see especially the abstract. 1-4 5-25 2. Chemical Abstracts, volume 105, no. 17, issued 1986, L.T. Hall, "Isolation and partial purification of an inhibitor to interleukin 1". See page 539, column 2, the abstract no. 151238 w Diss. Abstr. Int. B, 1986, 46(12), pt. 1, 4191. 1-4 5-25 3. Chemical Abstracts, volume 107, no. 25, issued 1987, K. Williamson "Bioassay for interleukin-1 inhibitors", see page 287, column 1, the abstract no. 234307K. J. Immunol. Methods, 1987, 102(2), 283-4 (Eng). 1-25 4. Chemical Abstracts, volume 108, no. 17, issued 1988, D. L. Rosenstreich, "Human interleukin-1 inhibitors", see page 559, column 1, the abstract no. 146372a. Lymphokines, 1987, 14, 63-89 (Eng). 1-25	

第1頁の続き

⑥Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号
C 12 N 15/12	ZNA	
C 12 P 21/00		
// A 61 K 37/02	ABC	C 8214-4B
	ABE	8615-4C
(C 12 P 21/00)		
(C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/00)		
C 12 R 1:19)		

優先権主張 ④1988年8月31日④米国(U S)④238,713

④1988年11月3日④米国(U S)④266,531

⑦発明者	エイゼンバーグ, ステファン, ビー.	アメリカ合衆国	コロラド州	80302, ボウルダー, パノラマ ア ベニュー 2325
⑦発明者	トムブソン, ロバート, シー.	アメリカ合衆国	コロラド州	80303, ボウルダー, ルハイ スト リート 1820
⑦発明者	アレンド, ウィリアム, ビー.	アメリカ合衆国	コロラド州	80207, デンバー, モントヴェュー ブルバード 4157
⑦発明者	ジョスリン, フェネック, ジ ー.	アメリカ合衆国	コロラド州	80220, デンバー, マゴハ ストリ ート 1900
⑦発明者	ソマー, アンドリアス	アメリカ合衆国	カリフォルニア州	94518, コンコード, オーク グローヴ ロード 117